

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## LA PLACE DU TRÉPONÈME DE CULTURE SOUCHE REITER DANS LA SÉROLOGIE DE LA SYPHILIS

par P. GASTINEL, A. VAISMAN et A. HAMELIN (\*).

*(Institut Alfred-Fournier et Institut National d'Hygiène)*

La sérologie de la syphilis avec les antigènes lipidiques est sans cesse l'objet de perfectionnements et, malgré les nouvelles méthodes employant les antigènes à base de cardiolipine, cette sérologie est encore souvent en défaut, soit par manque de sensibilité, soit — ce qui est encore plus grave — par sa non-spécificité.

En effet, les examens systématiques pratiqués sur des collectivités révèlent de plus en plus de réactions faussement positives pouvant être créées par des infections autres que la syphilis ou attribuables à des modifications de l'équilibre physico-chimique du sérum au cours de divers états morbides.

On sait que la sérologie lipidique dérive de la réaction de Wassermann, Neisser et Bruck [1], qui se servaient à l'origine d'extraits de foie d'hérédosyphilitique, très riches en tréponèmes ; mais les travaux de Levaditi et Marie [2] et ceux de Landsteiner [3] ont montré que le pouvoir antigénique de ces extraits était dû aux lipides de l'organe lui-même et non aux substances spécifiques du tréponème.

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 1<sup>er</sup> décembre 1955.

C'est le fait de l'impossibilité de la culture du spirochète qui avait déterminé Wassermann à utiliser des extraits d'organes riches en spirochètes. Noguchi [4] ayant, en 1912, réalisé cette culture, expérimenta le spirochète en tant qu'antigène, obtint des résultats satisfaisants, et conclut à la supériorité de sa réaction qui mettait en évidence des anticorps spécifiques dans le sérum, alors que celle de Wassermann révélait seulement la présence de substances lipotropes dénommées actuellement « réagines ». Cependant, la majorité des auteurs qui utilisèrent par la suite la culture de Noguchi, enregistrèrent des résultats contradictoires.

En 1929, Gaetgens [5], utilisant la culture de *tréponèmes de Reiter*, réussit à préparer un antigène d'une sensibilité supérieure à celle des extraits lipidiques et, d'après lui, d'une rigoureuse spécificité. En outre, il arriva même à séparer par absorption les réagines des substances réagissant spécifiquement vis-à-vis des tréponèmes, et les considéra comme les véritables anticorps de la syphilis, allant même jusqu'à nommer sa technique « Pallida-reaktion ».

Les travaux de Gaetgens furent confirmés par Beck [6], par Eagle et Hogan [7] et surtout par l'école italienne avec d'Alessandro [8] et Puccinelli [9], mais contestés par Kolmer, Kast et Lynch [10]. Malgré toutes ces recherches, la Pallida-reaktion resta pendant de longues années au stade expérimental, et ne fut utilisée que dans quelques laboratoires allemands.

L'introduction, en 1949, du test d'immobilisation de *Treponema pallidum* par Nelson et Mayer [11] a résolu le problème du séro-diagnostic de la syphilis en ce qui concerne la *spécificité*. Mais la pratique du test de Nelson restant, malgré les simplifications apportées à la méthode originale, délicate et difficilement réalisable pour la majorité des laboratoires, de nombreux auteurs sont à la recherche de méthodes plus simples, mais qui présenteraient la même sécurité quant à la spécificité. La réaction d'agglutination des tréponèmes, déjà réalisée par Touraine [12] en 1912, a fait de nouveau l'objet de nombreux travaux, principalement ceux de Hardy et Nell [13], et ceux de Mac Leod et Magnuson [14], mais n'est pas encore arrivée au stade de la pratique courante.

C'est probablement cette même raison qui détermina certains chercheurs à entreprendre de nouveaux travaux avec l'antigène fourni par la souche Reiter, parmi lesquels nous citerons, en France, Pautrizel, Szersnovicz et Gimenez [15], Benazet, Brottes, Thivolet et Sohier [16], Hardy, Boruand et Durel [17].

Bien que le test de Nelson soit couramment et régulièrement pratiqué dans notre laboratoire puisque, en cinq années, nous avons effectué une trentaine de mille de réactions, nous poursuivons également l'étude des autres méthodes, principalement



celles qui comportent un antigène tréponémique, en les comparant au test d'immobilisation pris comme critère de spécificité.

Nous apportons dans le présent travail les résultats obtenus avec l'antigène préparé à partir de la culture de tréponème, souche Reiter, comparés à la fois avec la sérologie lipidique et avec le test de Nelson.

#### PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE REITER.

L'origine de la souche Reiter est assez obscure. Selon Muster [18], la souche aurait été isolée en 1922 par Wassermann

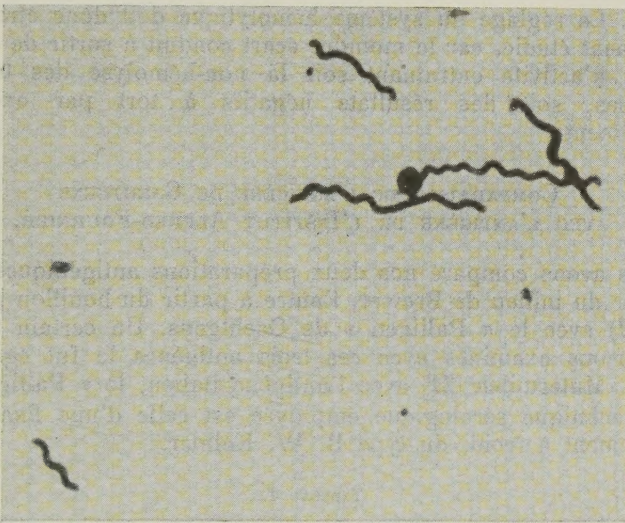


FIG. 1. — Tréponème de Reiter : culture de 5 jours — formes longues, courtes, et granule terminal.

et Ficker [19], et reprise par Reiter [20], qui l'adapta à un milieu de culture relativement simple, et c'est ainsi qu'elle prit le nom de Reiter. Mais quant à l'origine de l'isolement, il reste parfaitement inconnu. Morphologiquement, ce spirochète est différent de *Treponema pallidum* et les cultures sont dépourvues de toute virulence pour les animaux sensibles au virus syphilitique.

La souche avec laquelle nous travaillons nous a été obligeamment remise par d'Alessandro, à qui nous adressons tous nos remerciements. Le tréponème de Reiter cultive abondamment en milieu liquide, soit en milieu de Brewer au thioglycolate additionné de 10 p. 100 de sérum, soit simplement dans un bouillon

peptoné et glucosé avec également 10 p. 100 de sérum. Il n'est nullement nécessaire de se mettre en conditions d'anaérobiose. Des cultures de 8 jours sont centrifugées et le dépôt tréponémique est lavé à plusieurs reprises en eau physiologique, puis remis en suspension dans de l'eau physiologique phénolée à 3 p. 1 000, constituant ainsi l'antigène pour la réaction de fixation de complément.

Cet antigène est en général utilisé non dilué ou très faiblement, contrairement aux antigènes lipidiques qui sont employés à des dilutions très grandes. On est amené ainsi à travailler à la limite de son pouvoir anti-complémentaire, car sa dilution entraîne une chute rapide de sa sensibilité lui enlevant ainsi son principal intérêt. Le réglage du système hémolytique doit donc être minutieusement étudié, car le moindre écart conduit à sortir de la zone optima d'activité entraînant soit la non-hémolyse des témoins-antigènes, soit des résultats négatifs à tort par excès de complément.

COMPARAISON DE L'ANTIGÈNE DE GAEHTGENS  
AVEC L'ANTIGÈNE DE L'INSTITUT ALFRED-FOURNIER.

Nous avons comparé nos deux préparations antigéniques (l'une à partir du milieu de Brewer, l'autre à partir du bouillon peptoné glucosé) avec le « Palligen » de Gaehtgens. Un certain nombre des sérums examinés avec ces trois antigènes le fut également par M. Mutermilch [21] avec l'antigène italien, le « Pallignost ».

La technique sérologique employée est celle d'une fixation de complément à froid, du type B. W. Kolmer.

TABLEAU I.

Sérum No	Antigène tréponémique de Gaehtgens	Antigène tréponémique de l'I.A.F. (milieu Brewer)	Antigène tréponémique de l'I.A.F. (milieu I.A.F.)	T.P.I. *	B.W. Kolmer	B.W. Demanche	Kline	Kohn standard	Kohn quantitatif
17.054	+++	+++	+++	100	+++	+++	++	+	1
17.104	+++	+++	+++	100	+++	+++	+++	+++	32
17.144	+++	+++	+++	100	+	+	+	-	0
17.203	++	+++	+++	100	++	++	+	+	1
17.246	+++	++	+++	71	+	-	+	+	1/2
17.254	+	++	+	64	+	-	+	+	1/2
17.432	+++	++	++	65	±	-	±	±	0
17.437	+++	++	++	100	-	-	±	-	0
17.705	+++	+++	+++	95	-	-	±	±	1/2
17.931	+++	++	++	60	-	-	±	±	1/2
18.104	+	+++	+++	90	-	-	±	±	0
18.109	+	++	+	100	-	-	±	±	0
18.121	+	++	+	73	-	-	±	±	0
19.914	+++	+	+	97	++	+	-	+	2
19.924	+	+	+	100	+++	+++	+	±	1
19.940	+++	+++	+++	91	-	-	±	±	0
20.000	+++	+++	+++	100	-	-	±	-	0
20.123	+	+++	+++	100	++	+	±	-	0
20.453	+++	+++	+++	100	+	-	±	-	0
20.476	+++	+	+	100	-	-	++	+	1
22.345	+++	+	+++	100	+++	+++	++	++	4
22.352	+++	++	+++	100	+++	+++	+++	++	4
22.299	+++	+	+	100	-	-	±	±	1/2
20.412	+	+	+	100	-	-	±	-	0
20.520	+++	+++	+++	100	+++	+++	±	-	0

Le tableau I donne les résultats comparés de ces trois antigènes avec le test de Nelson et la sérologie classique, dans un de nos essais.

Ces résultats, donnés à titre d'exemple, ainsi que de nombreux essais comparables, permettent de conclure que les trois antigènes de tréponèmes de culture, à savoir : l'antigène original de Gaetgens et les deux antigènes préparés dans notre laboratoire, se sont montrés de sensibilité et de spécificité pratiquement égales, qu'il s'agisse de sérums faiblement ou fortement positifs aux autres méthodes, sérologie classique et test de Nelson. Nous devons ajouter que les résultats obtenus sur les mêmes sérums par M. Mutermilch avec l'antigène italien « Palignost » sont identiques aux nôtres.

#### SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DE L'ANTIGÈNE REITER.

Cinq cent onze sérums ont été soumis comparativement à la sérologie classique lipidique, au test d'immobilisation et à la réaction de fixation de complément avec l'antigène Reiter.

Le tableau II groupe les résultats obtenus et fait ressortir la concordance ou la discordance des trois méthodes.

TABLEAU II.

	T.P.I.	Reiter	BW	nombre de sérums	%
1	+	+	+	209	40,90
2	-	-	-	201	39,35
3	+	-	-	10	1,95
4	+	-	+	15	2,95
5	+	+	-	38	7,45
6	-	+	+	10	1,95
7	-	+	-	4	0,75
8	-	-	+	24	4,70

Ce tableau permet de constater :

1° Une *concordance* de positivité entre les trois méthodes pour 209 sérums, soit 40,9 p. 100.

2° Une *concordance* de négativité pour 201 sérums, soit 39,35 p. 100.

Donc pour 410 sérums, soit 80,25 p. 100 des cas, l'antigène



Reiter nous a donné des résultats identiques à la sérologie classique et au test d'immobilisation (T. P. I.).

Des *discordances* chez 101 sérums, soit un pourcentage de 19,75 p. 100.

En prenant comme critère de sensibilité et de spécificité le test de Nelson, ces discordances se répartissent comme suit :

3° T. P. I. positif, Reiter négatif et B.-W. négatif : 10 sérums (1,95 p. 100).

4° T. P. I. positif, Reiter négatif et B.-W. positif : 15 sérums (2,95 p. 100).

5° T. P. I. positif, Reiter positif et B.-W. négatif : 38 sérums (7,45 p. 100).

Le Reiter, comparé au T. P. I., a donc manqué de sensibilité pour 25 (4,90 p. 100) de nos sérums, tandis que le B.-W. a été en défaut pour 48 (9,40 p. 100) sérums.

La sensibilité du Reiter est, dans l'ensemble, supérieure à celle de la sérologie classique, quoique certains sérums répondent mieux aux réactions lipidiques.

6° T. P. I. négatif, Reiter positif et B.-W. positif : 10 sérums (1,95 p. 100).

7° T. P. I. négatif, Reiter positif et B.-W. négatif : 4 sérums (0,75 p. 100).

8° T. P. I. négatif, Reiter négatif et B.-W. positif : 24 sérums (4,70 p. 100).

Nous avons relevé 14 sérums positifs au Reiter malgré un T. P. I. négatif, soit 2,70 p. 100 des cas, alors que les réactions faussement positives de la sérologie lipidique se montent au nombre de 34 (6,65 p. 100). La spécificité du Reiter est donc nettement supérieure à celles des réactions classiques, bien que 0,75 p. 100 des sérums soient faussement positifs au Reiter seulement.

#### ETUDE EXPERIMENTALE.

Nous avons déjà mentionné que la souche Reiter était dépourvue de tout pouvoir pathogène, même pour les espèces sensibles à la syphilis. Toutefois, il nous a paru intéressant de comparer, du point de vue sérologique, le comportement des animaux ayant reçu des injections répétées de fortes quantités de tréponèmes de culture avec celui de lapins neufs ou de lapins syphilités expérimentalement.

Des lapins reçurent par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, trois injections de 6 cm<sup>3</sup> d'une émulsion concentrée de tréponèmes Reiter, à dix jours d'intervalle. Le sérum de ces animaux fut examiné avant l'inoculation, le trente-septième jour, puis le cent quatre-vingt-unième jour après. En voici les résultats :

Avant inoculation, le sérum de ces animaux donna une réaction

faiblement positive avec l'antigène Reiter, comme nous l'avions déjà constaté pour la majorité des lapins neufs (7 sur 8 animaux examinés), positivité qui, généralement, se constate également avec les antigènes lipidiques, cardiolipidiques ou non. Par contre, le test de Nelson s'est toujours montré négatif chez tous ces animaux.

Mais les réactions quantitatives pratiquées sur les sérums de ces lapins, après les inoculations de tréponèmes Reiter, démontrèrent une augmentation très marquée de la positivité vis-à-vis de cet antigène passant de 4 unités à 16 et 32 unités au trente-septième jour, taux qui s'est maintenu à ces chiffres au cent quatre-vingt-unième jour. La sérologie lipidique suit, à peu de chose près, la même courbe. Toutefois, le test de Nelson fut trouvé constamment négatif sur tous les prélèvements.

Six lapins syphilités avec la souche Nichols furent examinés dans les mêmes conditions. Le T. P. I., négatif avant l'infection, se positiva vers le cinquantième jour et atteignit rapidement 100 p. 100, pourcentage qu'il conserva chez la majorité des animaux jusqu'à la fin de nos observations (quatre cent cinquante-huit jours). Vis-à-vis des antigènes lipidiques, comme de l'antigène Reiter, les réactions faiblement positives chez la plupart des animaux avant la syphilisation s'intensifièrent progressivement, atteignant le taux de 16 à 32 unités pour l'antigène Reiter. chiffre analogue à celui enregistré dans la série des lapins qui reçurent le tréponème Reiter.

Il résulte donc de ces essais que l'injection de tréponèmes Reiter chez le lapin détermine une élévation assez prononcée du taux des anticorps sériques, décelable par l'antigène homologue, mais également par les antigènes lipidiques, alors que le test de Nelson reste parfaitement négatif. Au contraire, chez les animaux syphilités, les trois méthodes fournissent parallèlement des résultats positifs.

La constante négativité du test de Nelson observée chez les lapins préparés par des injections de tréponèmes Reiter fut retrouvée également chez les souris ayant reçu la même culture, alors que la souris syphilitée donne un T. P. I. nettement positif.

#### DISCUSSION ET CONCLUSION.

Le tréponème de culture (souche Reiter), dont l'origine reste inconnue, fut introduit en tant qu'antigène, pour le séro-diagnostic de la syphilis, par Gaetgens, en 1929, mais resta non exploré jusqu'à ces dernières années. Grâce à l'école italienne d'Alessandro et Puccinelli, son étude revint à l'ordre du jour et on lui reconnaît actuellement des qualités de sensibilité et de spécificité supérieures à celles des antigènes lipidiques.



L'antigène tréponémique de Reiter est en général utilisé en réaction de fixation de complément de la même manière que les antigènes lipidiques, mais permettrait de mettre en évidence non seulement les « réagines » mais également des anticorps différents. Après les expériences contradictoires de Gaetgens, Klopstock [22], Beck, Eagle et Hogan, l'école italienne réussit à isoler de la culture du Reiter trois antigènes distincts :

- 1° Un antigène thermolabile de nature protidique ;
- 2° Un antigène thermostable de nature polysaccharidique ;
- 3° Un antigène lipidique, assimilable aux antigènes d'extraits organiques.

C'est la fraction protidique qui, selon eux, serait le support de la spécificité.

Cependant, l'absence de culture de *Treponema pallidum* ne nous permet pas de conclure à une similitude antigénique entre les deux tréponèmes.

La plus grande sensibilité de l'antigène préparé à partir du tréponème Reiter comparé aux antigènes lipidiques pourrait être attribuée aux fractions protidique et polysaccharidique, mais sa spécificité n'atteint pas celle du test de Nelson.

De plus, la manipulation de cet antigène est délicate, sa zone de réactivité étant très étroite et voisine de la limite de son pouvoir anti-complémentaire, qu'il s'agisse de l'antigène original de Gaetgens, du Pallignost italien, ou des antigènes préparés dans notre laboratoire.

#### RÉSUMÉ.

L'antigène préparé à partir du tréponème de Reiter présente un grand intérêt pour le séro-diagnostic de la syphilis, du fait de sa grande sensibilité, supérieure à celle des antigènes lipidiques, y compris ceux à base de cardiolipine. Sa spécificité, plus satisfaisante que celle des antigènes précédents, reste cependant moins fidèle que celle du test de Nelson. L'étroite limite de sécurité de son utilisation en fait pourtant une technique délicate.

#### SUMMARY.

The antigen prepared from the spirochaete of Reiter is of great interest in the sero-diagnosis of syphilis, owing to its great sensitivity, superior to that of the lipid antigens, including the cardiolipic antigens. Its specificity, higher than that of the preceding antigens, remains however lower than that of the Nelson test. The narrow safety limit, however, represents a serious practical difficulty.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. WASSERMANN, A. NEISSER et BRUCK. *Dtsch. med. Wsch.*, 1906, **39**, 745.
- [2] C. LEVADITI et A. MARIE. *Ann. Inst. Pasteur*, 1907, **21**, 138.
- [3] LANDSTEINER, MULLER et PÖTZEL. *Wien. klin. Wsch.*, 1907, n<sup>os</sup> 46 et 50.
- [4] H. NOGUCHI. *J. exp. Med.*, 1911, **14**, 99 ; *J. Am. med. Assoc.*, 1912, **58**, 1163.
- [5] W. GAETGENS. *Med. Klin.*, 1929, **25**, 390 et 873 ; *Z. Immun. Forsch.*, 1929, **63**, 398.
- [6] A. BECK. *J. Hyg.*, 1939, **39**, 298.
- [7] H. EAGLE et R. B. HOGAN. *J. exp. Med.*, 1940, **71**, 215.
- [8] D'ALESSANDRO et coll. *Boll. Soc. It. Biol. sper.*, 1941, **16**, 469 ; 1946, **22**, 376 ; *Boll. Ist. Sieroter. milan.*, 1946, **25**, 138 ; *Riv. Ist. Sieroter. Ital.*, 1948, **23**, 119 et 132 ; 1952, **27**, 153 ; *J. ven. Dis. Inform.*, 1950, **31**, 314 ; *J. Syph., gon. ven. Dis.*, 1953, **37**, 137.
- [9] V. A. PUCCINELLI et coll. *G. Ital. Dermat.*, 1946, **87**, 15 et 447, 1949, **90**, 229 ; *Sem. Hôp. de Paris*, 1953, **29**, 118.
- [10] J. A. KOLMER, C. C. KAST et E. R. LYNCH. *Am. J. Syph.*, 1941, **25**, 300 et 412.
- [11] R. A. NELSON et M. M. MAYER. *J. exp. Med.*, 1949, **89**, 369.
- [12] A. TOURAINÉ. *Thèse*, Paris, Faculté de Médecine, 1912.
- [13] P. H. HARDY et E. E. NELL. *J. exp. Med.* (sous presse).
- [14] C. McLEOD et H. J. MAGNUSON. *Pub. Hlth Rep.*, 1953, **68**, 747.
- [15] R. PAUTRIZEL et coll. *Bull. Soc. Fr. Derm.*, 1953, **80**, 395 et *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1954, **92**, 141.
- [16] F. BENAZET et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 674.
- [17] N. HARDY et coll. *Bull. Soc. Fr. Derm.*, 1955, **82**, 55.
- [18] I. MUSTER. *Dermatologica*, 1942, **86**, 351.
- [19] A. WASSERMANN et M. FICKER. *Klin. Wsch.*, 1922, **4**, 1101.
- [20] H. REITER. *Dtsch. med. Wsch.*, 1925, **8**, 303 ; *Klin. Wsch.*, 1926, **5**, 444 ; *Dermat. Wsch.*, 1926, **83**, 1199 et 1926, **89**, 1401.
- [21] S. MUTERMILCH et M. DELAVILLE. *Ann. Biol. clin.*, 1955, **13**, 398.
- [22] F. KLOPSTOCK. *Dtsch. med. Wsch.*, 1926, **52**, 1460 et 1927, **53**, 1261.

# PRÉCIPITATION *IN VITRO* DU COLLAGÈNE A PAR UNE ENDOTOXINE BACTÉRIENNE

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

par ALBERT DELAUNAY, SUZANNE BAZIN et MICHELLE HÉNON (\*)

(Institut Pasteur, Annexe de Garches et C. N. R. S.)

J. Nageotte, en 1927, a montré que le collagène A, dissous dans un milieu légèrement acide, pouvait être précipité par l'addition de sels neutres de métaux monovalents [1]. Au cours de ces dernières années, pour provoquer la précipitation du même collagène, on a utilisé encore des corps chimiques divers : mucopolysaccharides, mucoprotéines, polysaccharides, acides nucléiques, etc. [2]. Il nous a paru intéressant de savoir si une endotoxine bactérienne purifiée pouvait, elle aussi, exercer une action précipitante.

Nous avons utilisé, d'une part, une solution de collagène A obtenue dans les conditions les plus classiques (tendons de deux queues de rat maintenus dans 100 ml d'eau acétifiée à + 4° pendant quarante-huit heures ; filtration sur gaze) ; préparations fraîches âgées au maximum de 4 jours et de pH 4,3.

D'autre part, nous avons mis en œuvre une endotoxine extraite de bacilles typhiques smooth par la méthode à l'acide trichloracétique de A. Boivin et purifiée à l'aide de plusieurs précipitations par l'alcool. L'endotoxine pulvérulente finalement obtenue a été remise en solution (à des concentrations variables) dans l'eau distillée.

## I. — MISE EN ÉVIDENCE

### D'UNE RÉACTION COLLAGÈNE-ENDOTOXINE TYPHIQUE.

*Expérience de base.* — Sont mis en contact dans un tube (pH du mélange : 4,3) 1 ml de la solution de collagène A (soit 1 mg de collagène) et 1 ml d'une solution renfermant 3 mg d'endotoxine par millilitre. Au cours des heures qui suivent, un précipité se forme ; au bout de vingt-quatre heures, il est assez abondant. A l'œil nu, il semble amorphe mais, au microscope, il est aisé d'y reconnaître une texture de fibrilles courtes et fines.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1955.



*Influence de la concentration en endotoxine.* — Cette fois encore, sont mis en contact en tube, et à pH 4,3, 1 ml de la solution de collagène A et 1 ml de la solution d'endotoxine mais, dans chaque millilitre, la concentration d'endotoxine varie : 1/16, 1/8, 1/4, 0,5, 1, 2, 3, 4 et 5 mg. Tubes conservés à la température du laboratoire (20°); examen au bout de vingt-quatre heures. *Résultats* : rien avec 1/16 de mg, léger louche pour 1/8 et 1/4 de mg, petit précipité pour 0,5 mg, précipité peu ou assez abondant pour 1 et 2 mg, précipité abondant et comparable pour 3, 4 et 5 mg. Ces résultats une fois notés, le contenu des tubes est centrifugé. Dans le liquide surnageant, on s'efforce de détecter la présence du collagène par addition de ClNa, de l'endotoxine par la réaction de Molisch et l'étude de la fluorescence (car la solution d'endotoxine est naturellement fluorescente). Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

QUANTITÉ D'ENDOTOXINE initialement présente dans le tube	ASPECT DU LIQUIDE surnageant	MOLISCH	FLUORESCENCE	Cl Na
1 mg . . . . .	légèrement opalescent (1)	+	++±	+
2 mg . . . . .	limpide	0	+±	±
3 mg . . . . .	limpide	0	+	0
4 mg . . . . .	limpide	0	++	0
5 mg . . . . .	très légèrement opalescent (1)	±	++±	0

(1) On sait que la solution d'endotoxine est naturellement opalescente.

La lecture de ce tableau montre qu'à la dose du milligramme la combinaison entre endotoxine et collagène se fait mal, puisqu'il reste en solution un excès des deux substances.

3 mg d'endotoxine semblent représenter au contraire une dose optimum, celle qui précipite au mieux les deux substances. Nous avons donc retenu cette dose pour tous nos essais ultérieurs.

*Influence du temps de contact.* — Dans une série de tubes sont mélangés 1 ml d'une solution de collagène et 1 ml d'une solution d'endotoxine, la dose d'endotoxine par millilitre étant variable : 1, 2, 3 ou 4 mg; temps de contact des deux préparations également variables : trente minutes, une, trois et vingt-quatre heures. A ce moment, centrifugation. Etude du surnageant comme ci-dessus (aspect, Molisch, fluorescence et ClNa). *Résultats* : 1 ou 2 mg d'endotoxine ayant été utilisés au départ, on remarque que, dans le liquide surnageant, les réactions qui concernent endotoxine et collagène diminuent progressivement d'intensité avec la durée du temps de contact (jusqu'à trois

heures). Au delà, aucune modification. Quand on a utilisé au départ 3 ou 4 mg d'endotoxine, les réactions observées dans le liquide surnageant restent identiques, que le temps de contact entre endotoxine et collagène ait été de trente minutes ou de vingt-quatre heures.

Ceci connu, nous avons retenu pour tous nos essais ultérieurs, outre des préparations d'endotoxine titrant 3 mg par millilitre, un temps de contact (entre collagène et endotoxine) de une heure.

*Influence du pH.* — 1° Solution d'endotoxine et solution de collagène sont ajustées au même pH.

pH 1,5 : léger précipité + ;  
pH 2 : précipité peu abondant + ± ;  
pH 2,5, 3 ou 4,3 : précipité normal + + +.

2° Le pH de la solution d'endotoxine est seul ajusté (rappe-  
lons que le pH normal de la solution de collagène est de 4,3).

pH 6 : précipité normal + + + ;  
pH 6,5, 7 et 7,5 : précipité moins abondant + ± ;  
pH 8, 9 et 10 : léger précipité + ;  
pH 11 : précipité très léger ± avec début de gélification ; le pH du  
mélange collagène-endotoxine est alors de 10,8.

CONCLUSIONS. — La combinaison collagène-endotoxine se fait normalement dans une marge de pH comprise entre 2,5 et 6 ; elle est gênée dans des marges comprises entre 1,5 et 2,5 et entre 6,5 et 10,5.

Mais qu'elle puisse se faire convenablement entre 2,5 et 6 suffit à indiquer que la marge nécessaire pour une bonne combinaison est large.

## II. — CARACTÈRES DE LA COMBINAISON COLLAGÈNE-ENDOTOXINE TYPHIQUE.

*Solubilité du précipité collagène-endotoxine.* — Le précipité est recueilli par centrifugation et mis en présence soit d'eau dont le pH a été ajusté à différentes valeurs par de petites quantités d'acide chlorhydrique ou de soude dilués, soit de divers produits en solution.

Eau à pH 1,5 : dissolution partielle.  
Eau à pH 2 : aucune dissolution.  
Eau à pH 4,3 : aucune dissolution.  
Eau à pH 10 : aucune dissolution.  
Eau à pH 11 : dissolution partielle.  
Eau à pH 12 : dissolution totale.

Dans le surnageant, Molisch	+	CINa	0
Dans le surnageant, Molisch	±	CINa	0
Dans le surnageant, Molisch	0	CINa	0
Dans le surnageant, Molisch	0 ±	CINa	0
Dans le surnageant, Molisch	+	CINa	0

Formamide : dissolution totale à la température ordinaire.

Salicylate de sodium (0,427 M) : dissolution totale à la température ordinaire.

Iodure de sodium (1,7 M) : dissolution totale à la température ordinaire.



$BrLi$  (0,427 M) : aucune dissolution.  
 $BrLi$  (0,85 M) : aucune dissolution.  
 $BrLi$  (1,7 M) : dissolution totale à la température ordinaire.  
 $Cl_2Ca$  (0,6 M) : dissolution totale à la température ordinaire.  
 $Cl_2Ca$  (0,5 M) : aucune dissolution à la température ordinaire ; dissolution à 46°.  
 $Cl_2Ca$  (0,3 M) : aucune dissolution à la température ordinaire ; dissolution à 48°.  
 $Cl_2Ca$  (0,2 M) : dissolution totale à la température ordinaire.  
 $Cl_2Ca$  (0,1 M) : dissolution totale à la température ordinaire.  
 $Cl_2Ca$  (0,05 M) : dissolution totale à la température ordinaire.  
 $Cl_2Ca$  (0,01 M) : dissolution totale à la température ordinaire.  
 $Cl_2Ca$  (0,005 M) : aucune dissolution à la température ordinaire.

### ACTION DE LA CHALEUR SUR LE PRÉCIPITÉ COLLAGÈNE-ENDOTOXINE.

1° *Chauffage du précipité collagène-endotoxine normal à différentes températures.*

Trois minutes à 45° : aucune modification.  
 Trois minutes à 48° : légère dissolution.  
 Trois minutes à 50° : légère dissolution.  
 Trois minutes à 52° : légère dissolution et agglomération en petits grains du précipité subsistant.  
 Trois minutes à 54° : légère dissolution et agglomération en petits grains du précipité subsistant.  
 Trois minutes à 56° : dissolution totale.

Dans le liquide chauffé à 56°, on trouve une réaction de Molisch fortement positive et, si on y ajoute quelques gouttes d'une solution du polysaccharide extrait du Carragaheen, apparition d'un assez gros précipité amorphe. On peut donc conclure : le précipité collagène-endotoxine commence à se dissocier à 48° ; à 56°, sa dissociation est complète.

2° *Chauffage du précipité collagène-endotoxine en présence de doses variables de  $Cl_2Ca$ .*

Précipité mis en suspension dans :  
 $Cl_2Ca$  0,5 M : trois minutes à 46° → dissolution totale.  
 $Cl_2Ca$  0,3 M : trois minutes à 48° → dissolution totale.  
 $Cl_2Ca$  0,005 M : trois minutes à 50° → dissolution totale.  
 $Cl_2Ca$  0,002 M : trois minutes à 56° → dissolution totale.

CONCLUSIONS. — En présence de  $Cl_2Ca$ , la température de dissociation du précipité collagène-endotoxine peut s'abaisser de 10° et, à certaines doses, jusqu'à la température ordinaire.

### LA FORMATION DU PRÉCIPITÉ COLLAGÈNE-ENDOTOXINE EST-ELLE MODIFIÉE PAR LA PRÉSENCE DE DIVERSES SUBSTANCES ?

*Sels* : 1°  $ClNa$  ajouté à l'endotoxine à dose non précipitante pour le collagène : aucune modification de la précipitation collagène-endotoxine ;

à 0,427 M (dose limite qui précipite le collagène) : on note une forte inhibition de la précipitation collagène-endotoxine ; il se forme un important précipité fibrillaire, type sel (qui est soluble dans l'eau acétifiée de pH 4,3) et un faible précipité collagène-endotoxine, insoluble dans l'eau acétifiée de pH 4,3 ;

*aux concentrations supérieures à 0,427 M* : on note une inhibition totale de la précipitation collagène-endotoxine ; prend place seulement un précipité fibrillaire type sel (soluble dans l'eau acétifiée de pH 4,3).

2° *Cyanure de sodium* (0,5 M) : ajouté à l'endotoxine, le cyanure inhibe la précipitation du collagène, mais il faut remarquer que le pH du milieu est alors de 10,5 (on se rappelle qu'à ce pH le précipité collagène-endotoxine se fait mal et que le milieu se gélifie, au moins en partie. Ce qui diffère en présence de cyanure, c'est qu'il y a, à la fois, absence de précipité et absence de gel).

*Oses* : 1° *Oses au 1/10 dissous dans la solution d'endotoxine avant l'addition de celle-ci à la solution de collagène* ; ont été étudiés : xylose, glucose, fructose, galactose, maltose et saccharose.

*Résultats* : La formation du précipité collagène-endotoxine, malgré la présence des oses, se fait normalement.

2° Dans des solutions d'oses à 10 p. 100 (ceux utilisés ci-dessus) on met en suspension un précipité normal collagène-endotoxine.

Nous n'avons jamais observé alors une dissolution du précipité.

*Polyoside : Carragaheen*. L'endotoxine typhique à l'état pulvérulent est dissoute dans une solution de Carragaheen à pH 4,3 (1). Concentration finale : 3 mg d'endotoxine par millilitre.

Quand cette préparation est mise en quantité égale en présence d'une solution de collagène, on note l'apparition d'un précipité fibrillaire type Carragaheen. Après centrifugation, le liquide surnageant apparaît opalescent (opalescence identique à celle de l'endotoxine) et il donne une réaction de Molisch fortement positive. On peut dire dans ces conditions que, lorsqu'il se trouve en présence à la fois d'une endotoxine et du polyoside extrait du Carragaheen, le collagène s'unit de préférence au dernier.

#### LA COMBINAISON COLLAGÈNE-ENDOTOXINE

##### SE FAIT-ELLE AVEC UN COLLAGÈNE A MODIFIÉ AU PRÉALABLE ?

1° *Essais avec un collagène chauffé*. — Le collagène A chauffé trois minutes à 42° (au bain-marie) ou à une température comprise entre 42 et 56° donne, en présence d'endotoxine, un

(1) Il s'agit exactement du liquide où a macéré à froid pendant trois heures du Carragaheen. On trouve dans cette préparation 0,6 mg d'extrait sec par millilitre.



précipité moins abondant (+ ±) que de coutume (+ + +). Toutefois, le précipité formé a le même aspect que celui obtenu avec un collagène non chauffé.

2° *Essais avec un collagène traité d'abord par le formol.* — Solution de collagène A formolé au 1/40, à pH 4,3. Temps d'action du formol : variable : zéro heure, une, trois, six ou vingt heures. *Résultats.* Mis en présence d'endotoxine, ces collagènes formolés se comportent comme des collagènes normaux. Les précipités obtenus ont un aspect normal.

Ces précipités, nous les avons, dans un second temps, centrifugés, lavés, puis remis en suspension dans de l'eau acétifiée de pH 4,3. Puis nous les avons chauffés. *Observations :* à 56°, aucune modification ; à 70°, les précipités se condensent en petits grains ; aux températures supérieures (→ 100°), pas de modification.

Après chauffage, le liquide ambiant reste limpide. Il donne un Molisch négatif et il est légèrement fluorescent.

On peut donc admettre que la combinaison endotoxine-collagène formolé est plus stable que la simple combinaison endotoxine-collagène.

#### LA COMBINAISON COLLAGÈNE-ENDOTOXINE PEUT-ELLE ÊTRE RENDUE PLUS STABLE ?

1° *Essais avec le formol.* — Des précipités collagène-endotoxine sont, à pH 4,3, traités par le formol à 0,5 p. 100, 1 p. 100, 2 p. 100, 5 p. 100, 10 p. 100 pendant des durées variables et à des températures variables.

*Formol à 1 p. 100.* Temps de contact : une heure à 37°. Aucune modification du précipité. Celui-ci est alors lavé, remis en suspension dans de l'eau à pH 4,3 et chauffé une heure à 56°. Il demeure inchangé. Chauffé à 70°, le précipité d'abord formolé se condense en grains. Le liquide ambiant reste limpide, il est très faiblement fluorescent et il donne un Molisch négatif. Mêmes observations après chauffage à 100°.

*Doses plus fortes de formol et temps de contact plus longs.* Observations identiques aux précédentes.

2° *Essais avec l'acide tannique.* — Des précipités collagène-endotoxine sont traités, une heure à 37°, par l'acide tannique au 1/1 000 000, 1/100 000, 1/10 000, 1/1 000. Le précipité prend, dans ces conditions, un aspect *macroscopiquement* fibrillaire. Il se dissout quand on le chauffe :

- à 58° (précipité traité par l'acide tannique au 1/1 000 000) ;
- à 58° (précipité traité par l'acide tannique au 1/100 000) ;
- à 60° (précipité traité par l'acide tannique au 1/10 000) ;
- à 90° (précipité traité par l'acide tannique au 1/1 000) ;

On a donc le droit de dire en conclusion que le formol et l'acide tannique augmentent, tous deux, la stabilité de la combinaison endotoxine-collagène. L'action du formol paraît cependant plus forte.

#### RÉSUMÉ.

On montre qu'un collagène soluble, comme le collagène A, peut se combiner avec l'endotoxine typhique, leur union donnant naissance à un précipité insoluble à pH 4,3. Dans un second temps, on étudie les différents caractères de la combinaison collagène-endotoxine.

Ce travail offre, semble-t-il, les motifs d'intérêt suivants :

1° Il étend les recherches en cours (à l'étranger aussi bien qu'en France [3]) sur la fibrillogénèse du collagène *in vitro* ;

2° Il apporte le *premier exemple* d'une combinaison possible entre un collagène soluble et une substance bactérienne dont la nature chimique est à peu près déterminée ;

3° Il appelle une étude systématique des propriétés biologiques particulières que possède probablement ce complexe collagène-endotoxine nouvellement formé (pouvoirs toxique et antigénique, notamment) ;

4° Et, à ce titre, il permettra peut-être de serrer, à l'avenir, de plus près, le mécanisme d'apparition des maladies dites du collagène ou, du moins, de certaines d'entre elles.

Nous tenons à exprimer à M<sup>lles</sup> Martine Henrion et Elizabeth Rieuf, aides techniques, notre reconnaissance pour l'aide précieuse qu'elles nous ont apportée tout au long de ce travail.

#### SUMMARY.

It is shown that a soluble collagen, such as collagen A, can combine with typhoid endotoxin to give an insoluble precipitate at pH 4.3. The different characters of the collagen-endotoxin combination have been studied.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. NAGEOTTE. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 828.
- [2] Voir en particulier J. GROSS, J. H. HIGHBERGER et F. O. SCHMITT. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **80**, 462.
- [3] Dans des notes ou mémoires à paraître prochainement, nous rapporterons les résultats que nous avons déjà obtenus en traitant des solutions de collagène A par des sels divers, des extraits de cordon ombilical humain, des polyosides obtenus à partir du Carragaheen, certains polypeptides et enfin des polyosides bactériens.



# ÉVALUATION DU POUVOIR ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-PERFRINGENS A. HISTORIQUE

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. GEOFFROY (\*)

(Institut Pasteur)

Les problèmes posés par la détermination de l'activité des sérums anti-*perfringens* ont préoccupé beaucoup d'auteurs.

Dans les premières publications, le titre des sérums était exprimé en unités provisoires dont les valeurs variaient d'un pays à l'autre [1].

En 1922, Henry [2] suggérait de déterminer l'action anti-hémolytique *in vitro* des sérums anti-*perfringens* pour apprécier leur pouvoir antitoxique. En 1928, Mason et Glenny [3], Dalling, Mason et O'Brien [4] appliquent ce procédé *in vitro* et recherchent parallèlement l'activité antitoxique *in vivo* des sérums anti-*perfringens* par le procédé des injections intraveineuses à la souris ; les résultats de leurs investigations *in vitro* et *in vivo* présentent une concordance satisfaisante. En 1931, P. Hartley [5] propose un sérum étalon anti-*perfringens* A analogue à l'étalon américain pour titrer les toxines *perfringens* destinées à l'évaluation du pouvoir antitoxique des sérums thérapeutiques. D'après le rapport de P. Hartley [5], différents expérimentateurs reçoivent en 1931 le même échantillon de toxine *perfringens* pour déterminer l'activité antitoxique d'un même sérum anti-*perfringens* ; les résultats de tous les dosages faits sur souris (injections intraveineuses) diffèrent au maximum de 10 p. 100.

En 1933, Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling et Ross appellent  $\alpha$  l'antigène létal, hémolytique et nécrosant élaboré par *W. perfringens*. Ces auteurs recherchent la teneur en antitoxine  $\alpha$  de nombreux sérums anti-*perfringens* [6] par la méthode hémolytique *in vitro*, par injection intraveineuse à la souris et par injection intracutanée au cobaye, les toxines employées au cours des titrages étant préparées de la même manière et généralement avec la même souche de *W. perfringens*. Glenny et ses collaborateurs

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1955.

constatent que les résultats des trois méthodes présentent rarement des différences supérieures à 20 p. 100.

En 1936, Weinberg et Guillaumie préparent avec la souche Lechien différents échantillons de toxine *perfringens* A en bouillon VI glucosé. La toxine est précipitée par le sulfate neutre d'ammonium, desséchée et titrée. Les doses L+ et LH/10 de chaque préparation sont précisées avec l'étalon anglais de 1931. Différentes de ces préparations sont utilisées comparativement pour évaluer le pouvoir antitoxique *in vivo* et l'action anti-hémolytique *in vitro* de nombreux sérums anti-*perfringens* (sérums de chevaux en cours d'immunisation). Le principe des titrages *in vivo* consiste à rechercher le volume de sérum qui, mélangé à la dose L+ d'une toxine, protège la moitié environ des souris injectées : le mélange de toxine et de sérum est laissé à 37° pendant quarante-cinq minutes avant d'être injecté par voie veineuses à des souris blanches de 17 à 20 g. Les déterminations *in vivo* de Weinberg et Guillaumie [7] montrent que le titre antitoxique d'un même sérum anti-*perfringens* varie souvent avec l'échantillon de toxine *perfringens* employé dans le titrage ; les écarts constatés entre les valeurs antitoxiques attribuées au même sérum peuvent être considérables : les titres trouvés diffèrent quelquefois de 50 et même 93 p. 100 suivant que le sérum est additionné d'une toxine ou d'une autre (1). D'autre part, Weinberg et Guillaumie n'observent pas toujours de parallélisme entre les résultats des titrages *in vivo* et les titres anti-hémolytiques déterminés *in vitro* avec les toxines de la souche Lechien [7 c]. Voici un exemple de titrages faits avec la toxine E32 en solution dans l'eau physiologique : le sérum 135 contient 45 unités d'après le titrage *in vivo* (en présence de la dose L+ de cette toxine) et 25 unités d'après le titrage *in vitro* ; le sérum 415 examiné dans les mêmes conditions titre 400 unités antitoxiques *in vivo* et 1 200 unités anti-hémolytiques *in vitro* (2).

En comparant deux sérums étalons anti-*perfringens* A capables d'annuler la nocivité du même poids d'une toxine *perfringens* donnée, engendrée par la souche Lechien, Weinberg et Guil-

(1) D'après les titrages *in vivo* effectués avec les toxines E5, E16, E18, E26, E33, le sérum 415 titre 450, 700, 400, 50 à 60 ou 350 unités ; le rapport entre les titres assignés à ce sérum varie donc de 1 à 14.

(2) L'unité anti-hémolytique dans ces titrages *in vitro* correspond à l'activité de 0,05 ml du sérum étalon anglais anti-*perfringens* A de 1931 (titrage avec des hématies lavées de mouton). De nombreuses déterminations *in vitro*, réalisées avec différentes préparations de toxine *perfringens* riche en hémolysine  $\theta$ , attribuent à présent au sérum 135 le titre de 20 à 25 unités anti-hémolytiques  $\theta$  et au sérum 415 le titre de 1 100 à 1 200 unités anti- $\theta$ . On peut voir dans le tableau II les titres anti- $\alpha$  de ces deux sérums éprouvés *in vivo*.

laumie [7 b, d, e, f, g, h] remarquent que ces deux étalons ne peuvent être utilisés indifféremment pour rechercher la dose L+ d'une autre toxine *perfringens* préparée avec la souche Lechien (3) ; ces auteurs vérifient que la forte activité hémolytique à 37° de leurs toxines en solution dans de l'eau physiologique et le pouvoir anti-hémolytique des sérums étudiés n'expliquent pas la diversité des résultats des titrages sur souris.

L'ensemble des résultats observés en France [7] met en lumière : 1° la variabilité de constitution des *toxines préparées en bouillon Vj avec la souche Lechien* et l'énorme répercussion de cette variabilité sur le titrage des sérums anti-*perfringens* ; 2° la complexité des sérums étalons. Aussi, Weinberg et Guillaumie pensaient, en 1937, que pour comparer la valeur globale des sérums préparés dans différents Instituts, il faudrait utiliser, pour titrer ces sérums, le même échantillon de *toxine-étalon* dont la dose L+ serait déterminée avec le même sérum étalon ; d'autre part, ils jugeaient nécessaire de poursuivre les recherches afin d'arriver à spécifier la richesse des sérums en anticorps vis-à-vis de chacun des antigènes *perfringens* essentiels : il est évidemment indispensable qu'un sérum thérapeutique contienne ces différents anticorps à un taux suffisant, et souhaitable de connaître ce taux.

Les divergences entre les résultats *in vivo* obtenus par Prigge [8], en titrant le même sérum avec des toxines *perfringens* inégalement hémolytiques, ont atteint, mais n'ont pas dépassé, 21 p. 100. H. W. Glotova [9], Ipsen, Llewellyn-Smith et Sordelli [10] ont expérimenté avec des toxines préparées avec diverses souches de *W. perfringens* à Moscou, à Beckenham, Francfort et Copenhague : leurs résultats n'ont pas présenté des écarts comparables à ceux de Weinberg et Guillaumie. Les discordances inouïes que nous avons observées en titrant le même sérum avec différents échantillons de toxine *perfringens* élaborée par la souche Lechien ont été examinées par la Commission de standardisation biologique au cours d'une réunion à Paris au mois d'octobre 1938 [11] : nous avons alors remis à M. Madsen la souche Lechien, la toxine E27 que nous avons préparée avec cette souche et les sérums 415 et 135 que nous avons si souvent titrés. J. Ipsen [12, 14], Ipsen et Davoli [13] ont éprouvé ces deux sérums et plusieurs autres par voie intraveineuse sur souris, par voie intradermique sur cobayes, par la méthode hémolytique en utilisant les hématies de mouton : la toxine française a été comparée à des toxines d'origine anglaise, allemande et danoise :

(3) Ainsi, une unité antitoxique des deux sérums étalons neutralise 1,45 mg de la toxine E15. Une unité antitoxique de l'un d'eux neutralise 2,6 mg de la toxine E19 tandis que l'unité de l'autre sérum neutralise seulement 1,1 mg de cette toxine.



les sérums ont été titrés en présence des doses L+, LN/10 et LH de ces toxines ; signalons dès maintenant que les résultats des titrages sur souris avec des toxines très hémolytiques à 37° en eau physiologique ont été comparables à ceux de Weinberg et Guillaumie (4). Quant aux titrages par voie intradermique sur le cobaye, ils présentent les difficultés que M. Llewellyn-Smith a énumérées [10].

De l'ensemble de ses observations, J. Ipsen [12, 13, 14] a tiré les conclusions suivantes :

a) Lorsqu'on utilise, comparativement, différentes toxines *perfringens* contenant de fortes quantités d'hémolysine  $\theta$  pour titrer un même sérum anti-*perfringens* A, les résultats des titrages sur souris diffèrent nettement de ceux observés *in vitro* par la méthode hémolytique [13].

b) Lorsque les toxines employées pour titrer le sérum sont des toxines de type  $\alpha$ , les résultats des dosages sur souris par voie veineuse correspondent à ceux des titrages sur cobayes par voie dermique et aussi à ceux des contrôles faits *in vitro* par l'épreuve hémolytique (5).

c) Dans le bouillon de Walbum et Reymann, la souche SS n'élabore pas l'antigène létal, non nécrosant  $\eta$  ; l'antigène  $\alpha$  qu'elle fait apparaître dans ce bouillon est accompagné de très peu d'hémolysine  $\theta$  ; par suite, les toxines préparées avec la souche SS dans un tel milieu peuvent servir à évaluer le titre anti- $\alpha$  des sérums anti-*perfringens* par le procédé sur souris : l'écart quadratique moyen des résultats observés en prenant ces toxines pour titrer un même sérum est de 10,5 p. 100 [14].

Nous avons aussi utilisé des toxines *perfringens* à antigène  $\alpha$  dominant et la souris comme animal d'expérience pour titrer différents sérums anti-*perfringens* A. Nous nous sommes servis de toxines élaborées par les souches SS et A100 P [15] ; ces toxines ont été dissoutes dans de l'eau physiologique à 9 p. 1 000 en ClNa et titrées ; nous avons d'abord déterminé leur dose minima hémolytique, c'est-à-dire la plus petite quantité de toxine qui lyse totalement les globules rouges contenus dans 0,1 ml d'une suspension à 5 p. 100 d'hématies lavées de mouton ; les mélanges de toxine et de globules rouges ont été laissés à 37° pendant quatre heures et à 2° pendant la nuit ; nous avons ensuite

(4) Ainsi, d'après les titrages *in vivo* faits par Ipsen avec les toxines E27, K10, W9 et W1, le sérum 415 titre 500 unités (E27), 320 (toxines K10 et W9) ou 63 (toxine W1).

(5) Cette donnée nous permet de déduire que Henry [2], Mason et Glenny [3], Dalling et ses collaborateurs [4] ont expérimenté avec des toxines *perfringens* de type  $\alpha$ .

évalué les doses L+ et LN/10 de ces toxines avec l'étalon anti-*perfringens* A de 1931 et calculé pour chacune d'elles la valeur du rapport LN/L+ (tableau I).

TABLEAU I. — Dose minima hémolytique (DHm) de 8 toxines *perfringens*. Titrages en présence d'eau physiologique. Valeur du rapport des doses LN et L+ de ces toxines.

NUMÉRO de la toxine	TOXINE ÉLABORÉE par la souche	DHm (en mg)	RAPPORT LN/L+
ES1 . . . . .	SS	0,02	1,3
ES3 . . . . .	SS	0,5	1,2
ES5 . . . . .	SS	0,2	1,2
ES10 . . . . .	SS	0,02	1,3
ES11 . . . . .	SS	0,4	1,4
ES12 . . . . .	SS	0,03	1,08
ES13 . . . . .	SS	0,15	1,06
EP5 . . . . .	A100 P	0,009	1,1

Nous reproduisons dans le tableau II une partie des résultats obtenus par J. Ipsen en utilisant le procédé des injections intra-veineuses à la souris pour titrer trois sérums (R. 5603, 415 et 135) en présence de différentes toxines à antigène  $\alpha$  dominant : deux d'entre elles, Prg. 590 et PENX 18, proviennent respectivement de Francfort et de Beckenham (6) ; les autres ont été préparées à Copenhague avec la souche SS. Nous ajoutons dans ce tableau les résultats que nous avons notés en recherchant le titre anti- $\alpha$  de différents sérums avec huit toxines de la souche SS (ES1, ES3, ES5, ES6, ES10 à ES13) et avec la toxine EP5 produite par la souche A100 P ; tous les dosages ont été effectués sur souris (veines).

L'examen attentif du tableau II indique qu'il n'est pas rare de trouver entre les résultats de J. Ipsen des divergences de 20 à 27 p. 100 ; certains présentent même quelquefois des écarts plus grands : les valeurs antitoxiques assignées au sérum anglais R. 5603 s'échelonnent entre 255 et 350 unités suivant les toxines employées dans les dosages ; les titres trouvés pour le sérum 135 sont compris entre 40 et 80 et ceux du sérum 415 entre 25 et 49. En considérant, dans le tableau II, les résultats obtenus à Copenhague et à Paris, on voit, par exemple, que le sérum 415 titre seulement 25 unités lorsque le dosage est fait avec la toxine Prg. 590, alors qu'il titre 36 unités anti- $\alpha$  d'après les déterminations effectuées avec la toxine anglaise PENX 18

(6) D'après les titrages de J. Ipsen, le rapport des doses LN et L+ de la toxine Prg. 590 est égal à 1,1 ; le rapport des doses LN et L+ de la toxine PENX 18 a pour valeur 1,2 [12].

et avec la toxine danoise B. 35 ; les titrages avec la toxine danoise XIII et avec les trois toxines françaises ES1, ES3, ES12 lui attribuent le titre de 35 unités anti- $\alpha$  ; les quatre toxines danoises X, XVI, XVIII, XX, les deux toxines françaises ES11 et ES13 lui octroient par contre le titre de 45 unités et la toxine XII le titre de 49 unités.

TABLEAU II. — Titre antitoxique de six sérums anti-*perfringens* déterminé avec différents échantillons de toxine *perfringens* à antigène  $\alpha$  dominant (titrages sur souris, injections intraveineuses).

Sérums anti- <i>perfringens</i>		Toxine de <i>Welchia perfringens</i>			Titrages effectués
Número	Titre ( U I )	Número de la toxine	préparée à :	Bouillon	
R. 5603	255	XV, XVI	Copenhague	+ viande	Copenhague
	318	X	"	+ viande	"
	350	XVIII	"	+ viande	"
415	25	Prg. 590	Francfort		"
	36	B. 35	Copenhague		"
	36	PENX 18	Beckenham		"
	35	XIII	Copenhague	+ viande	"
	45	X, XVI, XVIII, XX	"	+ viande	"
	49	XII	"	+ viande	"
	35	ES1, ES3, ES12	Paris	Vf+foie	Paris
	38 à 40	ES10	Paris	Vf+foie	"
	40	ES6	Paris	Vf+foie	"
	40 à 45	ES5	Paris	Vf+foie	"
	45	ES11, ES13	Paris	Vf+foie	"
135	40	Prg. 590	Francfort		Copenhague
	50	PENX 18	Beckenham		"
	60	B. 35	Copenhague		"
	56	XIII	"	+ viande	"
	70	XI, XII, XV, XVI	"	+ viande	"
	80	X, XVIII	"	+ viande	"
	63	K5, K7	"	Vf	"
	70	K3	"	Vf	"
	60 à 63	ES6	Paris	Vf+foie	Paris
	63 à 65	ES5	Paris	Vf+foie	"
	65	ES10	Paris	Vf+foie	"
3	150	ES1	Paris	Vf+foie	Paris
	225	ES3	Paris	Vf+foie	"
589	200	ES3	Paris	Vf+foie	Paris
	240	ES6	Paris	Vf+foie	"
	260	ES5	Paris	Vf+foie	"
	260 à 280	EP5	Paris	Vf	"
	300	ES10	Paris	Vf+foie	"
462	350				Tchécoslovaquie
	450 à 500	ES12	Paris	Vf+foie	Paris
	460	P. 1	Copenhague	+ viande	Paris



Le tableau II apporte en outre les données suivantes :

a) Le sérum 462 titre seulement 350 unités anti- $\alpha$  en Tchécoslovaquie. Il contient plus de 450 unités anti- $\alpha$  d'après les titrages récents que nous avons effectués, soit avec la toxine danoise P. 1 préparée par Ipsen [14], soit avec la toxine ES12 : nous avons employé, comme d'habitude, de l'eau physiologique pour dissoudre les toxines et diluer le sérum ; nous avons mis les mélanges de toxine et de sérum pendant quarante-cinq minutes à 37° avant de les inoculer par voie veineuse à des souris blanches de 17 à 20 g ; ensuite nous avons observé les souris pendant trois jours.

b) Les résultats des titrages avec les toxines danoises XVI et XVIII sont concordants dans le cas du titrage du sérum 415 et discordants dans le cas du titrage du sérum R. 5603.

c) On obtient des résultats discordants lorsqu'on emploie les toxines ES1 et ES3 pour titrer le sérum 3, alors que les résultats du titrage du sérum 415 avec ces toxines sont concordants.

d) Les toxines ES3 et ES10 assignent sensiblement le même titre au sérum 135 ; par contre, le sérum 589 titre 200 ou 300 unités suivant que la détermination est faite avec la première de ces toxines ou avec la deuxième.

Par conséquent, les résultats concordants que l'on obtient en titrant un même sérum anti-*perfringens* avec deux ou plusieurs toxines *perfringens* à antigène  $\alpha$  dominant ne permettent pas d'affirmer *a priori* que le titrage d'un autre sérum anti-*perfringens* avec ces mêmes toxines fournira des résultats concordants.

Les *discordances* que nous soulignons montrent la complexité du problème du titrage des sérums anti-*perfringens* A par le procédé des injections intraveineuses à la souris ; elles indiquent que les différences qui existent souvent entre divers lots de toxine *perfringens*  $\alpha$  préparés dans un ou plusieurs laboratoires exercent sur les résultats du titrage de l'antitoxine  $\alpha$  une influence d'une ampleur regrettable dont les conséquences pratiques n'échappent à personne. De nouvelles recherches sont nécessaires pour préciser l'ensemble des conditions expérimentales qu'il faudrait adopter dans tous les pays pour déterminer avec certitude *in vivo* le titre anti- $\alpha$  réel d'un sérum anti-*perfringens* A.

Les observations intéressantes faites indépendamment par Seiffert et Nagler ont donné à l'étude de la toxine de W. *perfringens* une orientation nouvelle.

En 1939, Seiffert [16] et Nagler [17] démontrent que les filtrats des cultures *perfringens* opacifient le sérum humain (SH) ; puis, après avoir constaté que les sérums anti-*perfringens* empêchent ce phénomène, Nagler décrit une méthode de titrage de ces

immunsérums en présence de SH comme indicateur : le titrage est fait vis-à-vis de deux doses mortelles de toxine.

Après avoir établi, d'une part, que la toxine *perfringens*  $\alpha$  décompose la lécithine avec libération de phosphorylcholine et de diglycéride, d'autre part, que les ions Ca, à une concentration convenable, intensifient cet effet, Mc Farlane et ses collaborateurs (1941) évaluent le titre anti- $\alpha$  des sérums anti-*perfringens* [18] en présence de lécithine ou d'une émulsion de jaune d'œuf (LV). D'après Oakley et Warrack (1941), les résultats du titrage des sérums anti-*perfringens* en présence de LV, de tampon peptoné et calcifié et de toxine *perfringens* appropriée concordent en général avec ceux des titrages sur souris et avec ceux des titrages par floculation [19].

En 1944, Grodko donne les résultats des titrages qu'il a effectués simultanément *in vivo* sur souris et *in vitro* avec du SH ; au cours des titrages *in vitro*, cet auteur utilise de l'eau physiologique additionnée de 0,3 p. 100 de phénol pour diluer les sérums à titrer et la toxine mise en œuvre. Grodko constate une concordance totale entre de nombreuses déterminations faites *in vivo* et *in vitro* ; cependant, il mentionne qu'il a observé des *discordances nettes* entre les résultats fournis par ces deux méthodes dans le cas des sérums titrant plus de 200 unités [20].

Pour mesurer l'activité lécithinasique de la toxine *perfringens*, Zamecnik, Brewster et Lipmann (1947) mettent au point une méthode manométrique ingénieuse [21], basée sur les faits suivants : la lécithinase *perfringens* en décomposant la lécithine met en liberté la phosphorylcholine ; celle-ci, en présence de bicarbonate de Na, provoque un dégagement de CO<sub>2</sub> ; en mesurant le volume de CO<sub>2</sub> formé, on évalue quantitativement la phosphorylcholine libérée par la toxine *perfringens* et par conséquent la quantité de lécithine hydrolysée. Zamecnik et Lipmann [22], Cinader [23] utilisent cette technique. De leurs expériences, il ressort que l'addition précoce de lécithine à un mélange de toxine *perfringens* et d'antitoxine homologue empêche fortement l'union de la toxine à l'antitoxine : pour neutraliser une quantité donnée de toxine, il faut davantage d'antitoxine *perfringens*  $\alpha$  quand cette antitoxine est mise en contact avec la toxine en même temps que la lécithine que lorsqu'elle est incubée avec la toxine avant d'ajouter la lécithine.

Van Heyningen (1941) applique le procédé turbidimétrique [24] au dosage de la toxine et de l'antitoxine *perfringens*  $\alpha$  ; il signale les résultats irréguliers qu'il a obtenus au cours du titrage de cette antitoxine (le mélange toxine et antitoxine est laissé trente minutes à la température ambiante avant l'addition de LV). En 1948, van Heyningen et E. Bidwel [25] font agir comparativement différents lots de toxine *perfringens* purifiée sur un sérum anti-

*perfringens* purifié ; ils évaluent généralement la toxine  $\alpha$  et son antitoxine par la méthode de floculation : après avoir constaté que des impuretés azotées se fixent sur les floccules toxine  $\alpha$ -antitoxine  $\alpha$ , ces auteurs pensent que l'on ne peut pas déterminer l'activité d'une préparation impure de toxine et d'antitoxine *perfringens* par des dosages d' $N$  au point de floculation.

Considérant que le phénomène de Danysz résulte du fait qu'une unité de toxine (T) peut se combiner à plus d'une unité d'antitoxine (A) et que le complexe  $TA_x$  formé (où  $x$  est supérieur à 1) peut réagir lentement avec la toxine pour former TA, van Heyningen et Bidwell essayent de déceler les complexes qui apparaissent dans les mélanges contenant des quantités croissantes de toxine *perfringens* purifiée et une quantité fixe d'antitoxine homologue (sérum purifié à la pepsine) ; les titrages de ces auteurs indiquent la formation de complexes allant de  $TA_x$  à  $TyA$  : les valeurs limites de  $x$  et  $y$  étant supérieures à 1 et variables avec les lots de toxine.

En 1952, Kemény et Illés [26] examinent des sérums anti-*perfringens* de titre élevé ; ils signalent que les résultats de leurs dosages sur souris concordent avec ceux des titrages *in vitro* faits en présence de LV et de deux doses mortelles de toxine *perfringens* précipitée par le sulfate d'ammonium, dialysée, lyophilisée puis dissoute dans un tampon boraté. Dans ces derniers titrages, les mélanges de toxine et d'antitoxine sont mis à 37° pendant trente minutes, ensuite additionnés de 0,5 ml de LV, placés à 37° puis examinés une heure et dix-huit heures plus tard.

Depuis 1946, nous avons titré de nombreux sérums anti-*perfringens* comparativement *in vivo* (souris) et *in vitro* (SH et LV), en présence d'un même échantillon de toxine *perfringens* à antigène  $\alpha$  dominant ; les mélanges toxine + sérum ont été placés à 37° pendant quarante-cinq minutes avant de les injecter aux souris ou avant de les additionner de SH ou de LV ; les résultats de ces titrages *in vivo* et *in vitro* ont souvent présenté une concordance satisfaisante [27 a et b]. Dans quelques cas, nous avons observé des discordances : certains sérums se sont montrés plus anti-lécithinasiqes *in vitro* qu'antitoxiques *in vivo*, d'autres au contraire ont manifesté une activité anti-lécithinasique *in vitro* inférieure au pouvoir anti-létal [27 a]. Ces faits nous ont incitées à comparer les résultats des titrages faits *in vitro* et *in vivo* avec différentes préparations de toxine *perfringens* précipitées par le sulfate neutre d'ammonium, essorées, desséchées à poids constant puis étalonnées. Au cours des titrages *in vivo*, nous avons utilisé des toxines à antigène  $\alpha$  dominant. Dans les essais *in vitro*, nous avons employé ces mêmes toxines et, parallèlement, des toxines complexes préparées avec les souches Lechien, SS, A100 P dans divers milieux glucosés à 1 p. 1 000. Les doses d'épreuve des



toxines que nous avons employées et les résultats que nous avons obtenus seront très prochainement exposés.

#### CONCLUSIONS.

Lorsqu'on emploie comparativement divers échantillons de toxine *perfringens* à antigène  $\alpha$  dominant pour déterminer le titre anti- $\alpha$  d'un même sérum anti-*perfringens* par le procédé des injections intraveineuses à la souris, on n'aboutit pas constamment à des résultats d'une concordance satisfaisante; on note assez souvent des résultats qui diffèrent de plus de 20 p. 100 (tableau II).

Après avoir obtenu des résultats concordants en titrant un sérum anti-*perfringens* avec plusieurs échantillons de toxine *perfringens*  $\alpha$ , on constate quelquefois que les déterminations du titre anti- $\alpha$  d'un autre sérum anti-*perfringens* avec ces mêmes toxines conduisent à des résultats discordants, bien que tous les dosages soient réalisés dans les mêmes conditions (souris, veines).

Les résultats du titrage de l'antitoxine  $\alpha$  par la méthode des injections intraveineuses à la souris et par la méthode lécithinase *in vitro* ne concordent pas dans certains cas.

#### SUMMARY.

When, comparatively, various samples of *perfringens* toxin containing predominant  $\alpha$ -antigen are used in order to determine the anti- $\alpha$  titer of the same anti-*perfringens* serum by the procedure of intravenous injections in mice, the results are not always satisfactory when compared with one another: variations of more than 20 % are frequently noted (table II).

When titration of a given anti-*perfringens* serum with several samples of  $\alpha$ -*perfringens* toxin yields comparable results, one sometimes observes different results when testing the anti- $\alpha$  titer of another anti- $\alpha$ -*perfringens* serum with the same toxins, even when identical techniques are used (mice, intravenous injections).

The results of the titration of antitoxin  $\alpha$  by the method of intravenous injection in mice and by the lecithinase method *in vitro* are different in certain cases.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. ROSENTHAL. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, **68**, 1044. — M. WEINBERG. *C. R. Acad. Sci.*, 1915, **160**, 325. — F. KLOSE. *Z. Hyg.*, 1916, **82**, 197; *Münch. med. Wsch.*, 1916, **63**, 723. — C. G. BULL et I. W. PRITCHETT. *J. exp. Med.*, 1917, **26**, 119, 603 et 827. — M. WEINBERG et P. SEGUIN. *La gangrène gazeuse*, 331 à 336,

- Masson, édit., Paris. — M. WEINBERG. *C. R. Soc. Biol.*, 1917, **80**, 958.
- [2] H. HENRY. *J. Path. Bact.*, 1922, **22**, 1.
- [3] J. H. MASON et A. T. GLENNY. *J. Path. Bact.*, 1928, **31**, 629.
- [4] T. DALLING, A. T. GLENNY, J. H. MASON et R. A. O'BRIEN. *Brit. J. exp. Path.*, 1928, **9**, 43.
- [5] P. HARTLEY. *Bull. trim. Org. Hyg. S. D. N.*, 1931, p. 13.
- [6] A. T. GLENNY, M. BARR, M. LLEWELLYN-JONES, T. DALLING et H. ROSS. *J. Path. Bact.*, 1933, **37**, 53.
- [7] M. WEINBERG et M. GUILLAUMIE. *C. R. Soc. Biol.*, a) 1936, **123**, 661 ; b) 1937, **126**, 656 ; c) *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **204**, 1012 ; d) *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1084 ; e) *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1938, **7**, 883 ; f) *Bull. Acad. Méd.*, 1939, **124**, 20 ; g) *Rev. Immunol.*, 1939, **5**, 5 ; h) M. GUILLAUMIE. *Annales Inst. Pasteur*, 1941, **66**, 204 et 329.
- [8] R. PRIGGE. *Actes du second Congrès intern. de Microbiol.*, Londres, 1936, p. 137 ; *Z. Immunitätsf.*, 1936, **89**, 477 ; 1937, **91**, 457.
- [9] H. W. GLOTOVA. *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, **59**, 526.
- [10] J. IPSEN, M. LLEWELLYN-SMITH et A. SORDELLI. *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1939, **8**, 859.
- [11] *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1938, **7**, 749.
- [12] J. IPSEN. *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1939, **8**, 890.
- [13] J. IPSEN et R. DAVOLI. *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1939, **8**, 899.
- [14] J. IPSEN. *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1939, **8**, 917.
- [15] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE. *Annales Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 513 ; 1944, **70**, 207 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 757.
- [16] G. SEIFFERT. *Z. Immunitätsf.*, 1939, **96**, 515.
- [17] F. P. O. NAGLER. *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 473.
- [18] M. G. Mc FARLANE, C. L. OAKLEY et C. G. ANDERSON. *J. Path. Bact.*, 1941, **52**, 99. — M. G. Mc FARLANE et B. C. J. G. KNIGHT. *Biochem. J.*, 1941, **35**, 884.
- [19] C. L. OAKLEY et G. H. WARRACK. *J. Path. Bact.*, 1941, **53**, 335.
- [20] N. S. GRODKO. *J. Microb., Epid., Immunol.*, 1944, n° 9, 38.
- [21] P. C. ZAMECNIK, L. E. BREWSTER et F. LIPMANN. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 381.
- [22] P. C. ZAMECNIK et F. LIPMANN. *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 395.
- [23] B. CINADER. *Biochem. Soc. Symposia Immunochemistry*, 1953, n° 10, 16.
- [24] W. E. VAN HEYNINGEN. *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1246 et 1257.
- [25] W. E. VAN HEYNINGEN et E. BIDWELL. *Biochem. J.*, 1948, **42**, 130.
- [26] L. KEMÉNY et E. ILLÉS. *Acta veter.*, 1952, **2**, 79.
- [27] M. GUILLAUMIE, A. KRÉGUER et M. FABRE. a) *Annales Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 384 ; b) *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 64.

# ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER DU SÉRUM DE DIFFÉRENTS SERPENTS

par HENRI PLAGNOL et ANDRÉ VIALARD-GOUDOU (\*).

(Institut Pasteur de Saigon)

Le fractionnement électrophorétique des protéines sériques des serpents venimeux est intéressant à deux points de vue :

Isolément des fractions protéiniques contenant des anticorps ;  
Comparaison entre les différentes espèces.

J. Fine, J. Groulade et A. Eyquem [4] ont procédé à l'étude par microélectrophorèse sur papier des sérums de deux vipères (*Vipera aspis* et *Vipera ursini*). Nous avons étudié de la même manière le sérum de trois espèces de serpents :

*Naja sputatrix* Boie ex *Naja tripudians* Linné (*Colubridae*) ;

*Ancistrodon rhodostoma* Boie (*Viperidae*) ;

*Trimeresurus gramineus* Shaw (*Viperidae*).

## I. — APPAREILLAGE.

a) Appareil pour électrophorèse sur papier de Machebœuf et Rebeyrotte (Laboratoires Leres) ;

b) Photomètre enregistreur des Laboratoires Leres.

## II. — TECHNIQUES.

a) D'électrophorèse : Machebœuf, Rebeyrotte, Dubert et M<sup>lle</sup> Brunerie [6] ;

b) De coloration des protéinogrammes : méthode lente de Durrum au bleu de bromophénol [2, 3] ;

— des glucidogrammes : méthode de Benhamou, Pugliese, Chiche et Amouch (coloration par le bleu de toluidine après une double oxydation à l'aide de l'acide periodique et du brome) [4] ;  
— des lipidogrammes : méthode de Swahn au Soudan noir [8].

La méthode de Kayser a été utilisée pour le dosage gravimétrique des protéines [5].

(\*) Manuscrit reçu le 17 octobre 1955.



## III. — RÉSULTATS.

a) LES COBRAS. — Les électrophorèses ont été faites sur 10 « pools » de sérum d'une dizaine de serpents chacun. Tous ces serpents ont été trouvés porteurs de parasites sanguicoles [hémogrégarines] (1).

1° *Résultats qualitatifs :*

Les globulines  $\alpha_1$  présentent deux pics distincts bien que très petits. Les autres fractions sont les mêmes que celles des sérums humains et leurs mobilités sont identiques (fig. 1).

Les glucides liés sont situés principalement sur l'albumine et sur les  $\beta$ -globulines.

Les lipides liés se retrouvent sur les  $\beta$ -globulines.

2° *Résultats quantitatifs :*

TABLEAU I. — Pourcentages des fractions protéiniques du sérum des cobras différenciées par électrophorèse sur papier.

SÉRUMS (Pools)	ALBUMINE en p. 100	GLOBULINES EN P. 100					RAPPORT A/G
		$\alpha_1$		$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$	
		$\alpha_1'$	$\alpha_2''$				
1. . . . .	40	3	4	3	13	37	0,66
2. . . . .	39	1	1	27	21	11	0,63
3. . . . .	17	2	2	19	30	30	0,20
4. . . . .	23	1	1	26	14	35	0,29
5. . . . .	13	4	1	29	24	29	0,14
6. . . . .	29	1	1	27	21	21	0,40
7. . . . .	16	4	3	28	23	26	0,19
8. . . . .	10	2	1	48	14	25	0,11
9. . . . .	34	2	1	23	17	23	0,51
10. . . . .	19	2	1	37	33	8	0,23

Les variations importantes des pourcentages portent principalement sur l'albumine et sur les  $\gamma$ -globulines. Si l'on excepte les « pools » C. 1 et C. 8, les globulines  $\alpha_1$  présentent une fixité assez remarquable.

b) LES VIPÈRES « ANCISTRODON RHODOSTOMA » BOIE. — Les 7 sérums examinés proviennent de 7 serpents. Aucun de ceux-ci n'a été trouvé porteur de parasites sanguicoles.

(1) Les sangs et les renseignements parasitologiques ont été fournis par M. Martin, du Laboratoire de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Saïgon, que nous remercions vivement de son obligeance.

## 1° Résultats qualitatifs :

Les globulines sont identiques et ont les mêmes mobilités que celles des sérums humains. Cependant, il faut remarquer que les globulines  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont mieux séparées (fig. 2).

L'albumine présente nettement deux fractions. Une de celles-ci

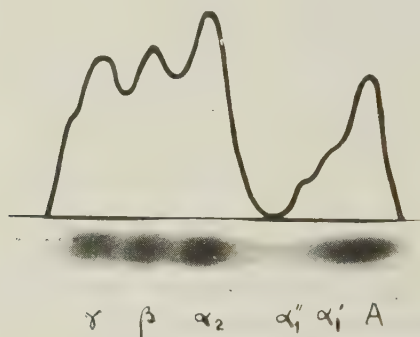


FIG. 1. — Electrophorèse de sérum de cobra.

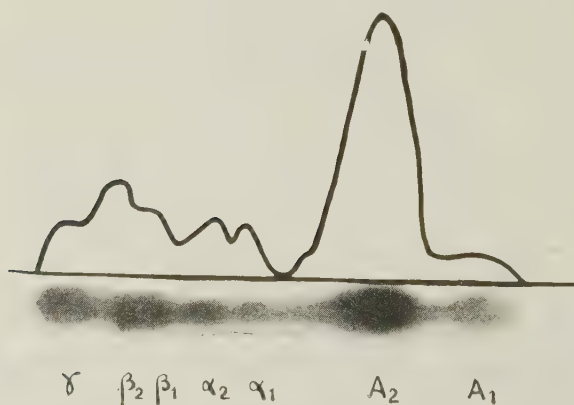


FIG. 2. — Electrophorèse de sérum de vipère, *Ancistrodon rhodostoma*.

est plus mobile que l'albumine humaine, l'autre est un peu moins mobile.

Les glucides liés sont situés presque uniquement sur les deux fractions albuminiques et les lipides se trouvent sur les  $\beta$ -globulines.

## 2° Résultats quantitatifs :

TABLEAU II. — Pourcentage des fractions protéiniques des sérums de *Ancistrodon rhodostoma* Boie différenciées par électrophorèse sur papier.

SÉRUMS	ALBUMINES en p. 100		GLOBULINES EN P. 100					RAPPORT A/G
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$	
1 . . . . .	3	67	2	4	7	9	8	2,45
2 . . . . .	6	16	7	14	24	32	1	0,49
3 . . . . .	9	43	2	7	20	3	16	0,88
4 . . . . .	5	35	6	18	15	13	8	0,66
5 . . . . .	17	27	2	15	16	15	8	0,78
6 . . . . .	13	43	12	12	13	13	1	1,27
7 . . . . .	6	26	7	14	24	22	1	0,47

Ici aussi les variations sont importantes et, exception faite des sérums 1 et 3, les globulines  $\alpha_1$  présentent un pourcentage relativement constant.

c) LES VIPÈRES, « TRIMERESURUS GRAMINEUS » SHAW. — Trois serpents nous ont fourni les sérums qui ont été examinés.

## 1° Résultats qualitatifs :

Les caractéristiques décrites pour les sérums de *Ancistrodon rhodostoma* Boie se retrouvent dans le sérum de ces vipères.

## 2° Résultats quantitatifs :

TABLEAU III. — Pourcentage des fractions protéiniques des sérums de *Trimeresurus gramineus* Shaw différenciées par électrophorèse sur papier.

SÉRUMS	ALBUMINES en p. 100		GLOBULINES EN P. 100					RAPPORTS
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\gamma$	
1 . . . . .	2	49	6	10	27	2	4	1,04
2 . . . . .	2	47	5	11	24	9	2	0,96
3 . . . . .	3	39	6	16	27	4	5	0,72

Ces résultats quantitatifs ne diffèrent pratiquement pas de ceux trouvés pour les espèces de *Viperidae* précédentes. Mais il est à remarquer qu'ils sont beaucoup plus constants.



## IV. — CONCLUSIONS.

TABLEAU IV. — Pourcentages moyens.

ÉLECTROPHORÈSE sur papier	<i>Naja spulatrix</i> BOIE	<i>Ancistrodon rhodostoma</i> BOIE	<i>Trimeresurus gramineus</i> SHAW	SÉRUM HUMAIN (Vietnamien)
Albumine A <sub>1</sub> . . . .	24	7	2,3	43
Albumine A <sub>2</sub> . . . .	2,2	36,7	45,6	
Globulines $\alpha_1$ { $\alpha'_1$ . . . .	1,6	5,4	5,6	4
$\alpha'_2$ . . . .	26,7	12	12,3	17
Globulines $\alpha_2$ . . . .	21	17	26	
Globulines $\beta_1$ . . . .	22,2	15,2	5	21
Globulines $\beta_2$ . . . .	0,33	6,4	3,6	15
Globulines $\gamma$ . . . .		0,57	0,90	0,75
Rapport A/G. . . .				
MÉTHODE GRAVI- MÉTRIQUE :				
Protides totaux. . . .	76,8	71,6	q. ins. (*)	75,6
Albumines. . . . .	31,7	q. ins. (*)	q. ins. (*)	42,2
Globulines. . . . .	46,9	q. ins. (*)	q. ins. (*)	33,4
Rapport A/G. . . . .	0,67			1,26

*Remarque.* — Encore moins qu'avec les sérums humains ou les sérums de Cobra les pourcentages trouvés avec les sérums de vipères ne représentent des chiffres réels. En effet, en dehors de l'imprécision générale de la méthode, l'erreur apportée par l'absorption d'albumine tout le long de la bande colorée (SOMMERFELT [7]) ne peut être que plus considérable. Il s'ensuit que même la comparaison avec l'électrophorèse d'un sérum humain faite sur le même papier n'est que peu valable.

(\*) q. ins. = quantité insuffisante pour le dosage.

On observe :

1° Du point de vue qualitatif :

Le dédoublement de la fraction  $\alpha_1$  des globulines dans les protéines sériques du cobra et le dédoublement des albumines sériques des vipères *Ancistrodon rhodostoma* et *Trimeresurus gramineus*.

2° Du point de vue quantitatif par rapport au sérum humain :

Chez le cobra : La diminution du pourcentage de l'albumine et l'augmentation du pourcentage des globulines  $\alpha_2$  également.

Chez les vipères « *Ancistrodon rhodostoma* » et « *Trimeresurus gramineus* » : La diminution considérable du pourcentage des  $\gamma$ -globulines.

Pour les deux premières espèces, des variations importantes des pourcentages des différentes fractions suivant les sérums examinés, mais une fixité relativement constante du chiffre des globulines.

## RÉSUMÉ.

Les fractions protéiniques de trois espèces de serpents venimeux ont été séparées par électrophorèse sur papier.

Des particularités intéressantes ont été mises en évidence tant du point de vue qualitatif que du point de vue quantitatif.

## SUMMARY.

The serum protein fractions of three species of venomous snakes have been separated by paper electrophoresis. Certain interesting features are evident from the qualitative and quantitative results obtained.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. BENHAMOU, J. PUGLIESE, J.-C. CHICHE et P. AMOUCH. *Presse médicale*, 1954, **62**, 651.
- [2] E. DURRUM, M. PAUL et E. SMITH. *J. Am. chem. Soc.*, 1950, **72**, 2943.
- [3] E. DURRUM, M. PAUL et E. SMITH. *Science*, 1952, **116**, 428.
- [4] J. FINE, J. GROULADE et A. EYQUEM. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 378.
- [5] FLEURY. *Fiches techniques de Chimie biologique*. Lib. Vega, Paris (1<sup>er</sup> supplément 1935).
- [6] M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE, J.-M. DUBERT et M<sup>lle</sup> BRUNERIE. *Micro-électrophorèse sur papier (Techniques et Applications)*. Lib. Antin, Paris, 1954.
- [7] SOMMERFELT. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1953, **5**, 299.
- [8] SWAHN. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1949, **28**, 1469.

# RECHERCHES SUR LES BACTÉRIES LYSOGÈNES DÉFECTIVES

## I. — DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA MORPHOGENÈSE CHEZ UN BACTÉRIOPHAGE TEMPÉRÉ

par FRANÇOIS JACOB et ELIE L. WOLLMAN (\*).

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne)

### Introduction.

La présence d'un prophage confère aux bactéries lysogènes certaines propriétés, notamment la capacité de produire spontanément du phage, l'immunité à l'égard des bactériophages homologues et, dans certains cas (souches inductibles), une sensibilité élevée à certains agents physiques ou chimiques (agents inducteurs) [1]. Chez différentes espèces bactériennes, on a pu isoler des souches chez lesquelles les processus qui conduisent à la production de bactériophage, spontanément ou après induction, sont altérés [2, 3, 4, 5]. Ces *souches défectives*, qui sont généralement stables, possèdent certaines des propriétés des bactéries lysogènes, en particulier l'immunité vis-à-vis des bactériophages homologues. Lorsqu'elles proviennent de bactéries lysogènes inductibles, les bactéries défectives peuvent conserver la propriété de se lyser après traitement par un agent inducteur approprié tel que le rayonnement ultraviolet, mais la production de bactériophage, aussi bien après induction que spontanément, reste très réduite.

Ces propriétés des bactéries lysogènes défectives indiquent à la fois la persistance, chez ces bactéries, d'une structure héréditaire, le prophage, et l'existence d'une lésion qui empêche le développement normal du prophage en bactériophage. Deux problèmes se trouvent posés par l'existence de cette lésion, l'un *génétique* qui a trait à la localisation de cette lésion — bactérienne, prophagique ou de la liaison hypothétique entre prophage et bactérie —, l'autre *physiologique* a trait aux effets de cette lésion sur la synthèse des constituants phagiques.

(\*) Manuscrit reçu le 20 novembre 1955.



Ces problèmes n'ont encore reçu que des solutions partielles. Dans le cas d'une souche déficiente d'*E. coli* K12, Lederberg et Lederberg [4] ont conclu à l'existence d'une lésion bactérienne alors que chez d'autres souches déficientes d'*E. coli* K12 également, Appleyard [5] pouvait exclure cette hypothèse et concluait à une lésion du prophage. Dans le cas d'une souche déficiente de *Bacillus megaterium* [6], Siminovitch a observé, après traitement par le rayonnement ultraviolet, un défaut de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique.

Il semble donc utile d'étudier divers types de bactéries lysogènes déficientes, toutes issues d'une même souche lysogène. La souche d'*E. coli* K12( $\lambda$ ), lysogène pour le bactériophage  $\lambda$  dont le système génétique est assez bien connu [7], semble constituer un matériel favorable.

Nous nous proposons de décrire, dans ce travail, une souche déficiente inductible dont la lésion prophagique permet cependant le développement du prophage en particules végétatives. Cette lésion, qui peut être localisée sur le groupe de liaison du bactériophage  $\lambda$ , permet la synthèse des différents constituants reconnaissables du bactériophage  $\lambda$ , mais empêcherait leur assemblage en particules infectieuses, c'est-à-dire leur maturation.

### Matériel et techniques.

Les propriétés des bactéries lysogènes K12( $\lambda$ ), du phage  $\lambda$  et de ses mutants, ainsi que les techniques et les milieux utilisés dans ce travail ont déjà été décrits [1, 7].

### Résultats expérimentaux.

#### I. — CARACTÈRES DE LA SOUCHE P14.

La souche lysogène déficiente P14 a été isolée à partir de la souche lysogène Y10, parmi les bactéries survivant à une forte dose de rayonnement ultraviolet. Comme les bactéries Y10 dont elles proviennent, les bactéries P14 sont incapables de synthétiser la thréonine, la leucine et la vitamine B<sub>1</sub>, et n'utilisent pas le lactose.

Dans les cultures de bactéries P14 en bouillon peptoné, on ne trouve qu'exceptionnellement des bactériophages  $\lambda$  (moins d'une particule pour 10<sup>8</sup> bactéries). Cependant, les bactéries P14, comme les bactéries Y10, sont immunes contre le phage  $\lambda$  et ses différents mutants, à l'exception du mutant virulent  $\lambda_v$ . Elles sont également capables de restaurer le phage  $\lambda_v$  préalablement inactivé par la lumière U.V. [1].

Après exposition à une dose de rayonnement U.V. qui induirait le développement du phage  $\lambda$  dans plus de 95 p. 100 des bactéries Y10 (dose optima), une culture de bactéries P14 se lyse après une période latente identique à celle observée chez le témoin Y10. Cependant, la fraction des bactéries induites qui forment un centre infectieux est très faible ( $10^{-7}$ ) et le rendement moyen est de l'ordre de 10 particules par bactérie productrice. Les particules ainsi libérées ne diffèrent apparemment pas du type  $\lambda$  sauvage produit par les bactéries Y10. Ces particules se développent normalement sur les bactéries sensibles K12S ; les bactéries qui se trouvent occasionnellement lysogénisées donnent naissance à des souches lysogènes normales.

★ ★

Il est donc apparent que les bactéries P14 perpétuent un prophage  $\lambda$ . Comme chez les bactéries lysogènes Y10, le choc inducteur provoque la lyse de l'ensemble de la population après une période latente caractéristique du phage  $\lambda$ . Le choc inducteur lève également l'immunité vis-à-vis de ce phage  $\lambda$ . Il est donc probable que l'induction fait passer le prophage dans la « phase végétative » et déclenche des biosynthèses létales. Les rares particules de phage  $\lambda$  formées seraient la conséquence d'une « mutation » du système défectif.

On peut considérer différentes hypothèses en présence d'une souche lysogène défective.

1° Une *lésion bactérienne* interdirait le développement en bactériophage d'un prophage normal. Les particules infectieuses formées le seraient à la faveur d'une « mutation » d'un caractère défectif bactérien. Cette hypothèse semble pouvoir être écartée dans le cas des bactéries défectives P14. Le fait que l'immunité soit levée après l'induction d'une part, la capacité des bactéries P14 à reproduire le mutant  $\lambda v$  et à restaurer celui-ci d'autre part, la rendent fort improbable.

2° Selon une autre hypothèse bactérie et prophage seraient normaux, mais le *développement végétatif* ne se produirait pas après l'induction. Les particules infectieuses formées exprimeraient la probabilité pour que ce développement se déclenche au cours de la période latente.

3° Selon une dernière hypothèse, le caractère défectif des bactéries P14 serait dû à une *lésion génétique du prophage*. Après l'induction, le matériel génétique phagique se multiplierait normalement. Les particules infectieuses formées seraient la conséquence d'une mutation du locus défectif vers la forme normale. Cette hypothèse, la plus vraisemblable, est vérifiée par l'expérience.

Dans la première partie de ce travail vont être analysées successivement les modalités selon lesquelles sont produites, après l'induction, les particules infectieuses de bactériophage  $\lambda$ , les arguments qui plaident en faveur d'une multiplication du matériel génétique phagique au cours de la période latente, puis les preuves de la localisation sur le prophage de la lésion responsable du caractère défectif des bactéries P14.

## II. — NATURE DE LA LÉSION RESPONSABLE DU CARACTÈRE DÉFECTIF.

1° EFFET DE LA DOSE DE RAYONNEMENT ULTRAVIOLET. — Alors que spontanément les bactéries P14 ne produisent pratiquement pas

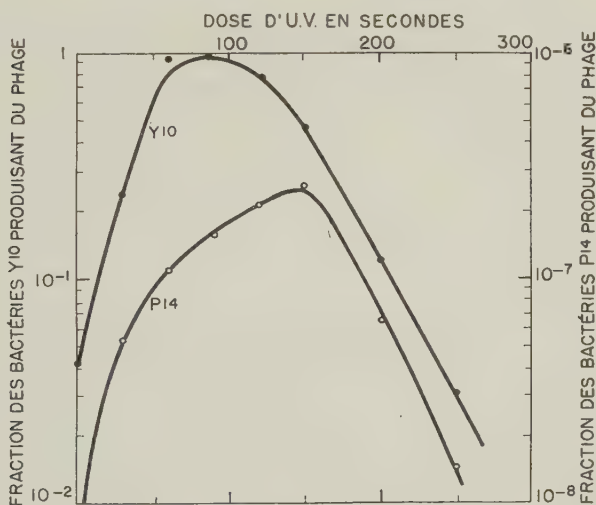


FIG. 1. — Courbes d'induction des bactéries Y10 et P14. — Des bactéries Y10 et P14, en voie de croissance exponentielle, sont exposées à des doses croissantes de rayonnement U. V., et des échantillons sont étalés sur gélose en présence de bactéries indicatrices. En abscisse, la dose d'U. V. en secondes. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, la fraction des bactéries produisant du phage.

de bactériophage  $\lambda$ , l'irradiation par la lumière ultraviolette induit la production de particules infectieuses chez une petite fraction des bactéries irradiées. On peut, en fonction de la dose d'U. V. appliquée à temps 0, suivre la production de phage  $\lambda$  par les bactéries P14 d'une part, et par les bactéries Y10 d'autre part. On constate (fig. 1) que la dose de rayonnement qui induit la fraction la plus élevée de bactéries P14 est sensiblement plus

forte que la dose optima inductrice pour les bactéries Y10. Il est vraisemblable que la formation, par les bactéries P14 irradiées, de particules infectieuses, est la conséquence d'une mutation du système déficient vers la forme normale et que la fréquence de cette mutation est fonction de la dose de rayonnement U.V. La courbe P14 de la figure 1 est d'ailleurs très comparable aux courbes obtenues par J. Weiglé pour la production de mutants de  $\lambda$  par irradiation de bactéries lysogènes K12( $\lambda$ ) [8].

2° EFFET D'UNE IRRADIATION APPLIQUÉE A TEMPS VARIABLES AU COURS DE LA PÉRIODE LATENTE. — L'expérience précédente semble

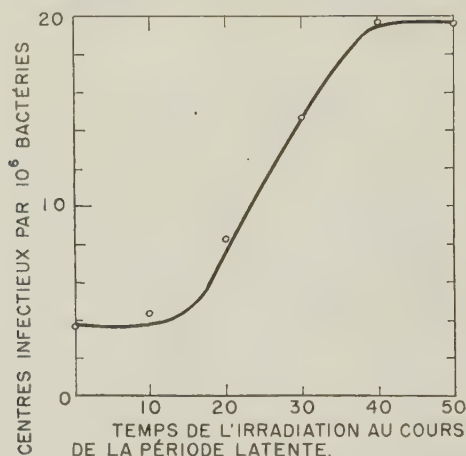


FIG. 2. — Variations du nombre des centres infectieux produits par P14 en fonction du temps de l'irradiation au cours de la période latente. — Une suspension de bactéries P14 est exposée à une dose inductrice (75 secondes) d'U. V. à temps 0, puis agitée à 37° en milieu nutritif. A des temps variables de la période latente, un échantillon est exposé à une seconde dose d'U. V. (75 secondes) et étalé sur gélose avec des bactéries indicatrices. En abscisse, le temps où l'on a exposé les bactéries à la seconde irradiation ; en ordonnée, le nombre de centres infectieux pour 10<sup>6</sup> bactéries induites.

indiquer que la production de particules infectieuses résulte d'une mutation du système déficient. On peut, après induction des bactéries P14 par une dose donnée de lumière ultraviolette, exposer les bactéries, à différents intervalles au cours de la période latente, à la même dose d'U. V., selon la méthode utilisée par Weiglé [8] pour induire des mutations du phage  $\lambda$ . Les résultats d'une telle expérience sont rapportés sur la figure 2 où l'on voit que le nombre des centres infectieux augmente lorsque la seconde irradiation est appliquée après la vingtième minute pour atteindre un maximum lorsque les bactéries induites ont été



à nouveau irradiées après quarante minutes. La période de vingt minutes au cours de laquelle la seconde irradiation reste sans effet correspond à la période nécessaire à un prophage normal pour effectuer sa transition vers le stade végétatif [4]. La période qui s'écoule entre la vingtième et la quarantième minute correspond vraisemblablement à la période au cours de laquelle s'établit la « réserve » (pool) de particules végétatives [9]. A moins d'admettre une variation de la sensibilité des bactéries P14 induites à l'action mutagène de la lumière U.V., les résultats de cette expérience semblent compatibles avec l'hypothèse selon laquelle le matériel lésé se multiplierait au cours de la période latente de la même manière que le matériel normal du bactériophage  $\lambda$ .

3° ANALYSE DES PRODUCTIONS INDIVIDUELLES. — Si, comme le suggère l'expérience précédente, le matériel génétique déficient se

TABLEAU I. — Productions individuelles de bactéries P14 induites.

Bactéries/ml	$2,7 \times 10^8$
Centres infectieux/ml après induction	84
Rendement moyen	12
<hr/>	
Nombre total de tubes	207
Nombre de tubes contenant du phage	54
Nombre de tubes devant contenir plus d'une bactérie productrice, d'après la distribution de Poisson	7
<hr/>	
Nombre de tubes contenant 1 phage	20
" " " " 2 "	11
" " " " 3 "	6
" " " " 4 "	5
" " " " 5 "	1
" " " " 6 "	2
" " " " 8 "	1
" " " " 9 "	1
" " " " 13 "	1
" " " " 16 "	1
" " " " 19 "	1
" " " " 48 "	1
" " " " 83 "	1
" " " " 107 "	1
" " " " 137 "	1

Des bactéries P14, préalablement exposées à une dose inductrice de rayonnement ultraviolet, ont été distribuées en tubes de manière à ce qu'une bactérie productrice soit contenue dans un tube sur 3 ou 4. Après 150 minutes à 37°, le contenu de chaque tube a été étalé sur gélose avec les bactéries indicatrices.

multiplie au cours de la période latente, l'analyse des productions individuelles de bactéries P14 induites devrait en apporter la confirmation.

Des bactéries P14, préalablement induites, sont distribuées en tubes à raison d'une *bactérie productrice* pour 3 ou 4 tubes. Après un temps suffisant pour que l'ensemble des bactéries se lysent, les différents tubes sont étalés sur gélose en présence de bactéries

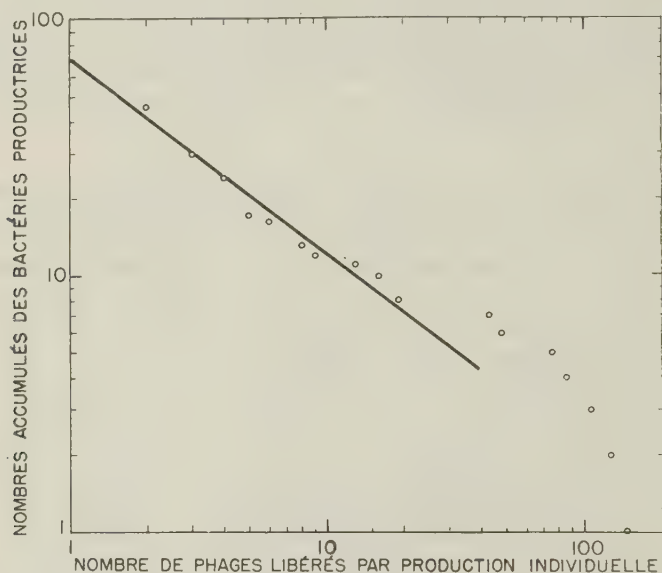


FIG. 3. — Distribution des particules de phages dans les productions individuelles des bactéries P14 induites. — En abscisse, sur une échelle logarithmique, le nombre de particules infectieuses par production individuelle. En ordonnée, sur une échelle logarithmique, les nombres accumulés de bactéries libérant une certaine quantité de phages.

indicatrices. On voit, sur le tableau I, que la grande majorité des bactéries productrices ne libèrent qu'un petit nombre de particules (plus du tiers en libèrent une, un cinquième en libèrent deux). Les résultats sont également représentés sur la figure 3 où l'on voit que la fréquence des rendements individuels selon la taille de ces rendements se répartit suivant une distribution analogue à la distribution observée par Luria [10] dans le cas de mutants spontanés du bactériophage T2.

Cette distribution des fréquences des rendements individuels en particules infectieuses indique d'une part que la mutation du caractère défectif vers la forme normale se fait au hasard au

cours de la période latente et, d'autre part, que la probabilité pour que cette mutation se produise croît exponentiellement au cours de la période latente. Elle permet d'exclure l'hypothèse selon laquelle le matériel génétique du prophage se « détacherait » du chromosome bactérien mais ne se multiplierait pas. Dans ce cas, en effet, on observerait une fréquence uniforme des rendements individuels de différentes tailles qui exprimerait la probabilité constante au cours de la période latente pour qu'une mutation de l'inactivité vers l'activité se produise. Le type de distribution clonale observé est en faveur de l'hypothèse selon laquelle un prophage défectif entre dans la phase végétative et se multiplie, la mutation vers la forme normale ayant d'autant plus de chance de se produire qu'il y a plus de particules végétatives, c'est-à-dire que la période latente est plus avancée.

L'excès observé de rendements individuels élevés pourrait être dû soit à l'induction de rares mutations précoces par le rayonnement ultraviolet (effet Weiglé), soit à la présence, dans une population de bactéries P14, de très rares bactéries lysogènes normales, trop rares pour qu'il ait jamais été possible de les isoler.

4° SURINFECTION DES BACTÉRIES P14 INDUITES, PAR UN MUTANT DE  $\lambda$ . — Les expériences précédentes semblent indiquer qu'après induction des bactéries P14 :

- 1° Le prophage entre dans la phase végétative ;
- 2° Les particules infectieuses produites sont le résultat d'une « mutation » ;
- 3° Le matériel génétique lésé se multiplie au cours de la période latente.

On sait que des bactéries lysogènes normales, induites, puis surinfectées avec un phage mutant, libèrent les deux types parentaux et, si ces types diffèrent par deux caractères génétiques, les deux types recombinants [7]. Si le type surinfectant est ajouté à temps variables au cours de la période latente, la proportion « type recombinant/type surinfectant » augmente entre le moment où le prophage entre dans la phase végétative (vingt minutes dans le cas de  $\lambda$ ) et celui où est atteint l'équilibre de la « réserve » (pool) de particules végétatives (quarante minutes). Des expériences de ce type réalisées avec les bactéries P14 induites doivent confirmer que le matériel génétique issu du prophage se multiplie au cours de la période latente et donner des indications sur la nature de la lésion responsable du caractère défectif.

Dans l'expérience représentée sur le tableau II, des bactéries Y10 d'une part, et P14 d'autre part, ont été surinfectées,

TABLEAU II. — Surinfection, par un phage mutant, de bactéries Y10 et P14 induites.

	Y10		P14	
Bactéries/ml	$1,2 \times 10^8$		$1,4 \times 10^8$	
Survivants après induction	0,015		0,012	
Phages $\lambda_{g_1c}$ adsorbés/ml	$3,9 \times 10^8$		$3,6 \times 10^8$	
Centres infectieux/ml	$1,1 \times 10^8$		$1,29 \times 10^8$	
Rendement moyen	189		163	
	Nombre	%	Nombre	%
Phages	$g_1c$	977 45,9	1921 82,1	
	++	844 39,7	62 2,65	
libérés	$g_1^+$	162 7,6	324 13,8	
	+c	146 6,8	22 0,95	

Des bactéries Y10 et P14, préalablement exposées à une dose inductrice de rayonnement U. V., sont surinfectées à raison d'environ 4 particules de  $\lambda_{g_1c}$  par bactérie. Après adsorption et neutralisation des phages libres par un antisérum spécifique, les suspensions sont diluées en milieu nutritif et laissées deux heures à 37°. Des échantillons sont alors étalés sur gélose avec les bactéries indicatrices.

aussitôt après l'induction, à raison d'environ 3 phages  $g_1c$  par bactérie. On sait que le phage  $\lambda$  produit par les bactéries Y10 est le type sauvage  $g_1^+c^+$  [7]. On peut tout d'abord constater que, dans l'un et l'autre cas, pratiquement chaque bactérie produit un centre infectieux et que le rendement moyen est légèrement plus faible dans le cas de P14 que dans celui d'Y10. Les proportions dans lesquelles les divers types de particules sont libérées sont cependant très différentes dans les deux cas.

Alors que les bactéries normales libèrent dans les proportions habituelles les deux types parentaux  $g_1c$  et  $g_1^+c^+$  (40 à 45 p. 100 de chaque) et les deux types recombinants  $g_1c^+$  et  $g_1^+c$  (environ 7 p. 100 de chaque), les bactéries défectives libèrent essentiellement des particules du type  $g_1c$  surinfectant (82 p. 100) et l'un des types recombinants  $g_1c^+$  (14 p. 100). Les particules des types  $g_1^+c^+$  et  $g_1^+c$  n'apparaissent qu'en très faible proportion (3,5 p. 100 au lieu de 46,5 p. 100). Il est donc clair que la lésion responsable du caractère déficient des bactéries P14 est une lésion génétique située dans la même région que  $g_1^+$ . On peut également remarquer que les particules ayant le caractère  $g_1$  sont libérées dans les mêmes proportions par les bactéries P14 et par les bactéries Y10 ( $R = g_1c^+/g_1c = 0,16$ ).

On peut suivre l'évolution de ce rapport R lorsque des bactéries P14 préalablement induites sont surinfectées à temps



variables par le phage  $g_{1c}$ . Les résultats d'une telle expérience où les bactéries P14 ont, après l'induction, été surinfectées à raison d'un phage  $g_{1c}$  pour 5 bactéries, sont illustrés par la figure 4. On voit que le rapport R augmente régulièrement entre la vingtième et la quarantième minute, ce qui confirme que non seulement « la lésion » mais l'ensemble du matériel génétique

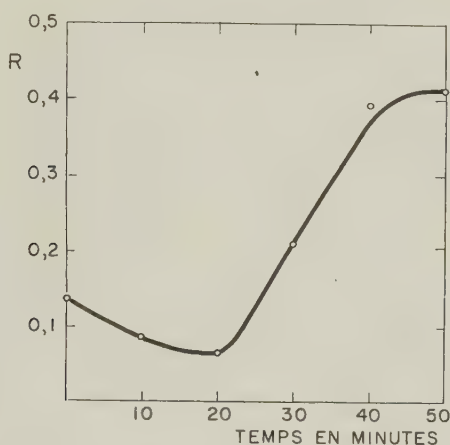


FIG. 4. — Surinfection à temps variables de bactéries P14 induites. — Des bactéries P14 sont exposées à une dose inductrice d'U. V. (temps 0), puis agitées en milieu nutritif à 37°. A des temps variables après l'induction, des échantillons de chaque culture sont infectés à raison d'environ 1 phage  $\lambda g_{1c}$  pour 5 bactéries. Après traitement par du sérum spécifique anti- $\lambda$ , ces suspensions sont laissées 150 minutes à 37° en milieu nutritif, puis étalées sur gélose en présence de bactéries indicatrices. En abscisse, le temps de surinfection. En ordonnée, le rapport  $R = \text{« nombre de recombinants } g_{1c}^+ / \text{nombre de particules du type surinfectant } g_{1c} \text{ »}$ .

provenant du prophage déficient des bactéries P14 se multiplie au cours de la période latente.

5° LOCALISATION DE LA LÉSION. — L'expérience de surinfection des bactéries P14 induites par le mutant  $g_{1c}$  indique qu'il existe sur le groupe de liaison génétique du prophage un locus responsable du caractère déficient et situé dans la région du caractère  $g_1^+$ . On peut, en surinfectant des bactéries P14 induites, avec d'autres mutants du phage  $\lambda$  convenablement choisis [7] tenter de localiser cette lésion d'une manière plus précise. Les résultats d'un certain nombre de croisements sont rapportés sur le tableau III où l'on voit que le caractère létal  $d_1$  est lié au caractère  $m_s$  (fig. 5).

TABLEAU III. — Surinfection, par différents phages mutants, de bactéries P14 induites.

Pl4( $\lambda$ +++) induit surinfecté par		Particules trouvées dans la descendance							
		Types parentaux		Recombinants région 1		Recombinants région 2		Recombinants doubles	
$g_1c$		$\frac{g_1c}{668}$	++	$\frac{g_1+}{96}$	+c				
	Nb	18		10					
	%	2,3		12,2	1,2				
$m_5g_1c$		$\frac{m_5g_1c}{1010}$	++	$\frac{+g_1c}{4}$	-	$\frac{m_5g_1+}{168}$	+c	$\frac{+g_1+}{4}$	-
	Nb	26		0,3		16		0,3	
	%	2,1		0,3		13,7	1,3	0,3	
$m_6g_1c$		$\frac{m_6g_1c}{892}$	++	$\frac{+g_1c}{58}$	-	$\frac{m_6g_1+}{138}$	+c	$\frac{+g_1+}{21}$	-
	Nb	27		5,1		16		1,9	
	%	2,4		5,1		12,1	1,4	1,9	
$g_1cm_1$		$\frac{g_1cm_1}{981}$	++	$\frac{g_1c+}{93}$	+c	$\frac{g_1++}{174}$	-	$\frac{g_1+m_1}{35}$	-
	Nb	28		10		0,72		2,7	
	%	2,2		7,1	0,72	13,2		2,7	

\* Pour les phages  $g_1^+c$  ainsi que  $g_1^+c+$ , on ne peut distinguer les deux types dus à la présence ou à l'absence du second gène déterminant la taille des plages ( $m_5$ ,  $m_6$  ou  $m_1$ ). Dans chaque cas, les deux types sont donc réunis dans une même catégorie désignée  $.g_1^+c.$  ou  $.g_1^+c+$ . Des bactéries P14, préalablement exposées à une dose inductrice de rayonnement U. V., sont surinfectées à raison d'environ 3 à 4 phages par bactérie. Après adsorption et neutralisation des phages libres par un antisérum spécifique, les suspensions sont diluées en milieu nutritif et laissées deux heures à 37°. Des échantillons sont alors étalés sur gélose avec les bactéries indicatrices.

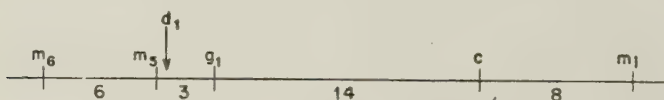


FIG. 5. — Groupe de liaison du bactériophage  $\lambda$ . — Les distances représentent la proportion en % des recombinants trouvés au cours de croisements entre phages différant par deux caractères (méthode de surinfection de bactéries lysogènes induites).

### III. — EXAMEN DES LYSATS DE BACTÉRIES P14 INDUITES.

Après traitement des bactéries P14 par la lumière ultraviolette, le développement du prophage déficient est induit et les bactéries se lysent au bout d'une période latente de durée normale en ne

libérant qu'un nombre infime de particules infectieuses. La rayonnement induit donc une biosynthèse létale.

Parmi les constituants d'un bactériophage dont la présence peut être décelée, l'acide désoxyribonucléique peut surtout être étudié grâce à ses propriétés génétiques, la protéine constituant la tête peut être observée au microscope électronique [11], la protéine de la queue possède un pouvoir bloquant vis-à-vis d'un sérum neutralisant anti-phage [12]. Il a été montré dans la première partie de ce travail que le matériel génétique phagique se multiplie normalement chez les bactéries P14 induites, mais qu'il est porteur d'un gène létal responsable du caractère défectif. On peut donc se demander si les autres constituants phagiques reconnaissables sont également produits par les bactéries P14 induites et poser le problème du rôle physiologique du gène létal perpétué par le prophage des bactéries P14.

Des lysats de bactéries P14 ont été préparés en induisant des cultures contenant de 2 à  $5.10^8$  bactéries/ml. Les débris bactériens ont été éliminés par centrifugation et les lysats stérilisés par quelques gouttes de chloroforme qui n'altère pas les propriétés du bactériophage  $\lambda$ . Des lysats de bactéries Y10 ont été préparés de la même manière pour comparaison. Ces lysats contiennent de 5 à  $15.10^{10}$  particules infectieuses/ml, alors que ceux de P14 n'en renferment que de 1 à  $3.10^3$ /ml.

1° RECHERCHE DE PARTICULES DÉFECTIVES. — Il se pourrait, tout d'abord, que le développement du prophage défectif aboutisse à la formation de particules défectives, c'est-à-dire de particules ayant la morphologie et la constitution du bactériophage  $\lambda$ , mais incapables de se multiplier sur des bactéries sensibles. Dans un travail récent, Appleyard [13] a conclu à l'existence de telles particules dans les lysats d'une souche de bactéries K12( $\lambda$ ) défectives.

Si de telles particules existaient dans les lysats des bactéries P14 et qu'elles fussent capables d'infecter des bactéries sensibles, il devrait être possible d'en déceler la présence. De multiples essais ont été tentés dans ce sens.

1° Etant donné que l'irradiation U. V. favorise la mutation  $d_1 \rightarrow d_1^+$ , des lysats irradiés de bactéries P14 ont été mis en présence de bactéries sensibles irradiées [8]. Aucun accroissement du nombre de particules infectieuses n'a été observé.

2° Des bactéries sensibles ont été mises en présence d'un lysat de bactéries P14, puis surinfectées par un mutant de  $\lambda$ . Il n'a pas été possible, parmi 10 000 plages examinées, de retrouver un recombinant possédant un caractère génétique provenant du prophage des bactéries P14.

3° Des bactéries sensibles ont été mises en présence d'un lysat

de bactéries P14, puis éprouvées par le phage  $\lambda$ c. Parmi les bactéries survivantes, aucune bactérie lysogène, déficiente ou non, n'a pu être retrouvée.

On peut conclure de ces expériences que s'il existe, dans les lysats de bactéries P14, des particules de phage déficient, elles sont présentes en quantités trop faibles pour pouvoir être décelées (moins d'une particule pour 100 bactéries P14 lysées). Il se pourrait, cependant, qu'après surinfection des bactéries P14 induites, conditions dans lesquelles se multiplient simultanément dans la même bactérie un matériel génétique déficient et un matériel génétique normal du phage  $\lambda$ , se produise un « mélange phénotypique » [14] ayant pour résultat la libération de particules déficientes et de particules infectieuses normales en proportion sensiblement identique. Il n'a pas été possible de mettre en évidence, dans les lysats de bactéries P14 induites puis surinfectées, la présence de particules déficientes.

2° EXAMEN DES LYSATS AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE. — Des lysats de bactéries P14 ont été examinés au microscope électronique par E. Kellenberger au laboratoire de Physique de l'Université de Genève (1). L'examen des photographies (pl. hors texte) révèle la présence de nombreuses particules aplaties dont le diamètre est analogue à celui du phage  $\lambda$  (80-100 m $\mu$ ), mais qui, contrairement à celui-ci, sont dépourvues de queue. Ces particules, qui sont présentes dans les lysats à raison de plusieurs dizaines par bactérie lysée, semblent correspondre aux particules observées après interruption de la multiplication du phage T2 par ouverture précoce des bactéries infectées ou par action de la proflavine [11] et décrites sous le nom de « doughnuts ». On sait que ces particules sont sédimentables à grande vitesse et ne contiennent que peu ou pas d'acide nucléique. Elles sont essentiellement formées de la protéine de la tête du phage et ne peuvent être spécifiquement adsorbées sur les bactéries sensibles.

Des essais préliminaires réalisés avec le culot de centrifugation à grande vitesse d'un lysat purifié de bactéries P14 ont montré, qu'après remise en suspension, le culot de centrifugation contient moins de cinq fois moins d'acide nucléique (mesuré par adsorption au spectrophotomètre de Beckman dans la longueur d'onde de 2 500 Å) que les phages contenus dans un lysat de bactéries Y10 traitées de la même manière.

3° EXAMEN SÉROLOGIQUE. — On peut rechercher si dans les lysats de P14 il existe des constituants phagiques capables de

(1) Nous tenons à remercier M. E. Kellenberger qui a eu l'obligeance de faire cet examen et de nous envoyer la photographie reproduite sur la planche hors texte.



bloquer le pouvoir neutralisant d'un immunosérum anti- $\lambda$ . Une étude analogue a déjà été réalisée par de Mars dans le cas d'*E. coli* B infecté par le phage T2 et traité par la proflavine [15]. Le principe des expériences consiste à mettre en contact une même dilution convenablement choisie d'un sérum anti-phage avec des concentrations variables du produit à éprouver. Après quelques heures de contact, suffisantes pour que s'accomplisse la réaction entre le sérum et le matériel antigénique, une petite quantité d'un mutant sélectivement décelable — dans le cas présent le phage  $\lambda v$ , titrable sur les bactéries K12( $\lambda$ ) — est ajoutée à chacun des mélanges. Après une durée de contact fixe, des échantillons de chacun des mélanges sont prélevés afin de déterminer la fraction survivante du phage test  $\lambda v$ . On peut ainsi déterminer la fraction des anticorps antiphages demeurés libres après contact avec le matériel antigénique éprouvé (antigène bloquant).

Au cours d'une même expérience ont été comparés les pouvoirs bloquants d'un lysat de P14, d'un lysat d'Y10 et d'une suspen-

TABLEAU IV. — Epreuve de neutralisation du sérum anti- $\lambda$  par le phage  $\lambda$  et par des lysats Y10 et P14.

Phage $\lambda v$ témoin/ml		255 x 10 <sup>4</sup>				
Phage $\lambda v$ survivant à l'inactivation par le sérum		7,1 x 10 <sup>4</sup>				
Lysat dilué à	Y10		P14		$\lambda$	
	$\lambda v$ survivant x 10 <sup>4</sup>	% du témoin	$\lambda v$ survivant x 10 <sup>4</sup>	% du témoin	$\lambda v$ survivant x 10 <sup>4</sup>	% du témoin
1/5	271	120	251	99	244	96
1/10	252	99	245	96	230	94
1/20	235	92	219	85	202	80
1/40	206	79	176	69	167	65
1/80	168	66	108	42	113	44
1/160	94	37	77	31	62	24
1/320	52	23	39	15	33,1	13
1/640	30,7	11	18,1	7	15,3	6
1/1280	13,7	6	10,9	4	10,8	4

Dans cette expérience ont été utilisés : 1° un lysat d'Y10 résultant de la lyse de  $6,2 \times 10^8$  bactéries/ml et contenant  $11 \times 10^{10}$  phages/ml ; 2° un lysat de P14 résultant de la lyse de  $4,9 \times 10^8$  bactéries/ml et contenant  $2,5 \times 10^3$  phages/ml ; 3° une suspension de phages  $\lambda$ , purifiée par centrifugations successives et ajustée de manière à contenir  $14 \times 10^{10}$  phages/ml ; 4° un sérum spécifique anti- $\lambda$  (K = 55) dilué à 1/3 000. A 0,8 ml de sérum sont ajoutés 0,2 ml de dilutions successives des préparations 1, 2 et 3. Après six heures à 37°, on ajoute 0,2 ml d'une suspension contenant  $1,3 \times 10^7$   $\lambda v$ /ml. Après trois heures à 37°, les suspensions sont diluées et étalées sur gélose avec des bactéries lysogènes qui révèlent seulement le phage  $\lambda v$ .

sion de bactériophages  $\lambda$  purifiés ayant le même titre en particules infectieuses que le lysat d'Y10. Les résultats de cette expérience sont rapportés sur le tableau IV et la figure 6. On peut en tirer les conclusions suivantes :

1° Les trois préparations contiennent des quantités comparables de matériel antigénique bloquant. En particulier, le lysat de P14

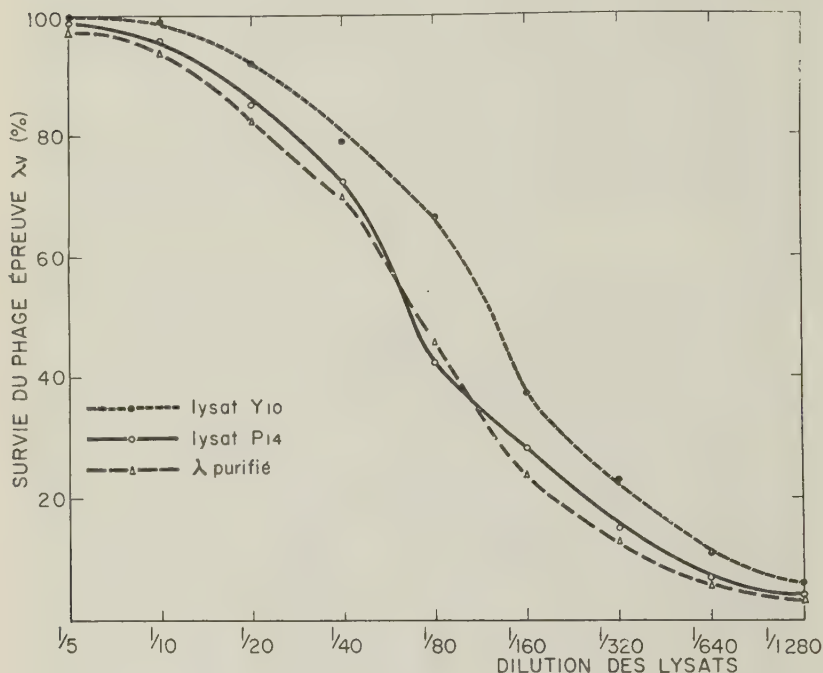


FIG. 6. — Dosage d'antigène dans des lysats Y10 et P14 et dans une préparation de phage  $\lambda$  purifiée. — Même expérience que celle dont les résultats sont représentés sur le tableau IV. En abscisse, sur une échelle logarithmique, la dilution de la préparation. En ordonnée, la fraction du phage-test  $\lambda_v$  survivant.

renferme un produit ayant la spécificité immunologique du bactériophage  $\lambda$  dans une concentration qui correspond à environ  $10^{11}$  phages  $\lambda$ /ml.

2° Le pouvoir bloquant d'un lysat de Y10 est plus élevé que celui d'une suspension purifiée de phage  $\lambda$  ayant le même titre en particules infectieuses.

On sait que les lysats bactériophagiques renferment, outre les bactériophages eux-mêmes, des matériaux possédant la spécificité antigénique du bactériophage et que Burnet [16] a appelé sub-

stance spécifique soluble (SSS). On peut démontrer, par centrifugation du bactériophage à grande vitesse ou par adsorption des bactériophages sur les bactéries sensibles, que la fraction soluble reste dans le liquide surnageant après centrifugation des particules infectieuses et n'est pas adsorbable sur les bactéries sensibles. Des expériences de ce type ont été réalisées comparativement avec les trois préparations précédemment décrites : un lysat de P14, un lysat d'Y10 et une préparation purifiée de phage  $\lambda$  de même titre que le lysat d'Y10. Les résultats de telles expériences sont illustrés par le tableau V où l'on voit que :

1° Avec la préparation de phage purifié, le matériel bloquant est centrifugé et s'adsorbe comme les particules infectieuses ;

2° Avec le lysat d'Y10, l'antigène soluble représente environ 40 p. 100 du pouvoir bloquant de la préparation. En effet, après adsorption de 84 p. 100 ou centrifugation de plus de 95 p. 100

TABLEAU V. — Distribution des antigènes contenus dans les lysats Y10 et P14 après centrifugation et adsorption sur des bactéries sensibles.

Préparation	Lysat Y10				Lysat P14				$\lambda$ purifié			
	Phages		antigènes		Phages		antigènes		Phages		antigènes	
	Nb/ml	%	UA	%	Nb/ml	UA	%		Nb/ml	%	UA	%
Préparation totale	$1,1 \cdot 10^{11}$	100	73	100	$< 10^4$	49	100		$1,4 \cdot 10^{11}$	100	60	100
Culot après centrifugation 30 min. à 50.000 g	$8,4 \cdot 10^{10}$	76	46	62	"	$< 2$	$< 4$		$1,0 \cdot 10^{11}$	71	49	82
Surnageant "	$1,3 \cdot 10^9$	1,2	28	39	"	45	92		$1,5 \cdot 10^9$	1	6	10
Surnageant après adsorption sur bactéries sensibles et centrifugation à basse vitesse	$1,7 \cdot 10^{10}$	16	35	48	"	46	94		$1,6 \cdot 10^{10}$	11	7	12

Des lysats Y10 et P14 et une suspension purifiée de  $\lambda$  (identiques à ceux utilisés dans l'expérience rapportée sur le tableau IV et la figure 6) sont soumis aux traitements suivants : 1° centrifugation à 50 000 g pendant trente minutes. Le culot est remis en suspension dans un volume identique au volume initial ; 2° 1 ml de chaque préparation est ajouté à 9 ml d'une suspension (en  $\text{SO}_4\text{Mg M}/100$ ) de bactéries sensibles contenant  $10^9$  bactéries/ml. Après trente minutes à 37°, les suspensions sont centrifugées à basse vitesse et le surnageant recueilli. Sur chaque préparation (lysat total, surnageant et culot remis en suspension après centrifugation à grande vitesse, surnageant après adsorption) stérilisée par du chloroforme, on effectue un dosage d'antigène par dilutions successives selon la technique décrite pour l'expérience du tableau IV. Les unités arbitraires (U. A.), utilisées pour exprimer les concentrations d'antigène, représentent l'inverse de la dilution qui, par extrapolation, correspond à une survie du phage d'épreuve  $\lambda_v$  égale à 50 p. 100. Une U. A. correspond approximativement à  $2,3 \times 10^9$  phages purifiés.

des particules infectieuses, il reste encore dans le surnageant respectivement 48 et 39 p. 100 du matériel antigénique ;

3° Enfin, dans les lysats de P14, pratiquement la totalité du matériel antigénique est incapable de s'adsorber sur les bactéries sensibles et n'est pas sédimentable à grande vitesse.

On sait que la protéine phagique sur laquelle se fixent les anticorps neutralisants des bactériophages est la protéine de la queue des particules par laquelle celles-ci s'adsorbent spécifiquement sur les bactéries sensibles [12]. La protéine de la tête est antigéniquement différente et ne possède aucun pouvoir bloquant vis-à-vis des sérums neutralisants antiphages [11]. Dans les lysats de bactéries P14 induites par le rayonnement ultraviolet, on retrouve donc des « têtes » de particules, visibles au microscope électronique, et des protéines de la « queue », non sédimentables, capables de bloquer le pouvoir neutralisant d'un sérum antiphage, mais cependant incapables de se fixer sur les bactéries sensibles. Les résultats sont en tous points comparables à ceux décrits par de Mars [15] dans le cas des bactéries infectées par le phage T2 en présence de proflavine.

### Discussion.

Au cours de la reproduction d'un bactériophage, le matériel génétique de celui-ci se multiplie (particules végétatives) et détermine la synthèse de protéines spécifiques. Dans un stade terminal, les matériaux protéiques sont assemblés et organisés autour de l'acide nucléique des particules végétatives (ADN) pour former les particules infectieuses. C'est ce processus de *maturation* qui est inhibé par la proflavine selon un mécanisme encore obscur [17, 15].

Lorsque des bactéries sont simultanément infectées par deux phages A et B — différents par leurs spectres d'activité, mais suffisamment apparentés pour donner lieu à recombinaison génétique tels que T2 et T4 — on obtient dans la descendance, outre des particules à la fois génotypiquement et phénotypiquement A ou B, des particules dont le génotype est A et le phénotype B et des particules de type inverse [14]. Ce *mélange phénotypique* indique que le matériel génétique de A et le matériel génétique de B induisent l'un et l'autre la synthèse de protéines spécifiques qui sont mises en commun (pool). Lors de la maturation, l'assemblage se fait au hasard et une particule végétative de génotype A a autant de chances de s'adjoindre une protéine de type A qu'une protéine de type B.

Nous avons vu que chez les bactéries P14 induites, le matériel génétique phagique se multiplie et que les protéines reconnaissables du phage  $\lambda$  sont synthétisées en quantités apparemment



normales. L'assemblage de ces différents éléments ne se produit cependant pas chez les bactéries P14 dont la lyse ne libère pas en nombre appréciable des particules ayant la morphologie ou les propriétés d'un bactériophage  $\lambda$ .

Il s'agit donc d'un défaut de la morphogénèse et nous avons vu que ce défaut se trouve sous la dépendance d'un gène  $d_1$  localisable sur le groupe de liaison du phage  $\lambda$ . Quant au rôle morphogénétique du gène  $d_1$ , son mécanisme demeure hypothétique.

Dans un premier groupe d'hypothèses, ce rôle pourrait être relativement indirect. Le gène  $d_1$  pourrait jouer un rôle dans la *synthèse d'un constituant protéique* « mis en commun » (un enzyme par exemple) qui pourrait, en dernier ressort, intervenir dans la maturation de n'importe quelle particule végétative. L'action du gène  $d_1$  aurait donc pour conséquence, soit la *synthèse d'une « mauvaise » protéine*, soit l'*absence de synthèse* d'un constituant essentiel inconnu. Après surinfection par un mutant de  $\lambda$ , celui-ci induirait la synthèse des constituants normaux et il se produirait dans les deux cas un « mélange phénotypique », plus prononcé dans le premier cas (25 p. 100 de particules infectieuses) que dans le second (50 p. 100). Dans les deux cas, cependant, on devrait observer la formation de « particules défectives » (où le génotype défectif se trouverait dans la « bonne » protéine) dans les mêmes proportions que les particules infectieuses. Un semblable mélange phénotypique devrait exister chaque fois que se produit la mutation  $d_1 \rightarrow d_1^+$ , comme résultat de la compétition pour la « bonne » protéine entre le génotype normal (minoritaire) et le génotype défectif (majoritaire). Les particules « défectives » ainsi formées pourraient être trop rares cependant pour être décelées.

Dans un second groupe d'hypothèses, l'effet du gène  $d_1$  pourrait s'exercer sur le *processus de maturation* lui-même. Tous les éléments nécessaires à la constitution de particules infectieuses seraient effectivement présents, mais une particule végétative de génotype  $d_1$  serait incapable d'en réaliser l'assemblage. On pourrait, par exemple, imaginer que l'une des réactions nécessaires à cet assemblage ne soit pas effectuée à l'aide de constituants « mis en commun », mais soit spécifiquement réalisée par chaque particule elle-même.

Toute hypothèse de ce genre a pour conséquence l'absence de mélange phénotypique, donc de particules « défectives », aussi bien après infection mixte que dans le cas des mutants spontanés.

Le fait qu'après surinfection de P14 induit le rendement moyen en particules infectieuses ne soit pas considérablement inférieur au rendement moyen normal semble permettre d'exclure l'hypothèse d'une « mauvaise protéine ». De même, le type de distribu-

tion observé pour les fréquences des rendements individuels selon leur taille, semble peu compatible avec une hypothèse permettant une compétition entre ADN de génotype  $d_1^+$  et ADN de génotype  $d_1$  pour une « bonne » protéine. Enfin, il nous a été impossible de déceler dans les lysats de bactéries P14 induits, surinfectées ou non par un mutant de  $\lambda$ , la présence de particules « défectives » dans le sens restrictif défini plus haut, c'est-à-dire de particules capables de s'adsorber et d'injecter leur matériel génétique dans les bactéries sensibles. Il semble donc, dans le cas des bactéries P14, que le premier groupe d'hypothèses puisse être exclu, ce qui conduirait à envisager un rôle direct de chaque particule végétative dans sa propre maturation.

Quel que soit le mécanisme exact du trouble de la morphogénèse analysé chez les bactéries P14, il est vraisemblable que des mécanismes divers, tels que ceux qui viennent d'être discutés, peuvent être en jeu dans le cas d'autres souches défectives. L'étude de telles souches doit permettre d'étendre nos connaissances sur les processus qui opèrent dans le développement et l'organisation des particules de bactériophage. Parmi les différentes souches défectives d'*E. coli* K12( $\lambda$ d) que nous avons isolées, on peut distinguer un certain nombre de types. A chaque type correspond une lésion génétique localisée sur un segment différent du groupe de liaison du bactériophage  $\lambda$ .

Les souches lysogènes défectives fournissent un exemple très remarquable car elles permettent l'étude génétique et physiologique de mutations létales. Les résultats préliminaires que nous avons mentionnés indiquent qu'il existe vraisemblablement, le long du groupe de liaison d'un bactériophage, un grand nombre de gènes qui gouvernent des fonctions « indispensables ». Une mutation du *prophage* survenant à l'un de ces loci, mutation létale pour le phage, sera indéfiniment conservée et indéfiniment transmise tant que le matériel génétique du phage demeure à l'état de prophage.

### Résumé et conclusions.

1° La souche lysogène défective P14, isolée à partir d'*E. coli* K12( $\lambda$ ) ne libère pas spontanément de bactériophage  $\lambda$ , mais conserve l'immunité de la souche originale envers le bactériophage  $\lambda$ . Après traitement par la lumière ultraviolette, l'ensemble des bactéries P14 se lysent (induction) mais ne libèrent qu'une très faible quantité de bactériophage  $\lambda$  (une particule pour  $10^6$  bactéries).

2° Au cours de la période latente qui suit le choc inducteur, le matériel génétique phagique se multiplie d'une manière compa-

nable à ce que l'on observe dans le cas de bactéries lysogènes normales.

3° Le caractère défectif des bactéries P14 est dû à une lésion du prophage. On peut localiser l'allèle  $d_1$  responsable du caractère défectif des bactéries P14 en surinfectant celles-ci, après l'induction, avec des mutants de  $\lambda$  génétiquement marqués.

4° Après induction des bactéries P14, celles-ci sont capables de synthétiser les protéines constituant la tête du bactériophage  $\lambda$  (que l'on retrouve sous forme de particules aplaties, vraisemblablement dépourvues d'acide désoxyribonucléique) et les protéines spécifiques du caractère antigénique de la queue (que l'on peut mettre en évidence par leur pouvoir bloquant vis-à-vis d'un sérum neutralisant antiphage).

5° Le caractère génétique  $d_1$  semble donc avoir un effet très comparable à l'effet obtenu avec la proflavine dans le cas des bactériophages T2. Dans les deux cas, c'est le processus de maturation des particules végétatives en particules infectieuses qui est empêché. Il semble, dans le cas des bactéries défectives P14, qu'il s'agisse d'une incapacité de chaque particule végétative à opérer sa propre maturation.

6° L'étude des bactéries lysogènes défectives, dont le prophage est porteur d'un allèle potentiellement létal d'un gène commandant une fonction indispensable, doit apporter des renseignements sur le déterminisme génétique et physiologique du développement et de la morphogenèse des bactériophages.

#### SUMMARY.

1° A defective lysogenic strain, P14, has been isolated among survivors of heavily U.V.-irradiated *E. coli* K12( $\lambda$ ). Defective P14 bacteria do not release spontaneously infectious particles but retain the same immunity pattern as normal lysogenic K12( $\lambda$ ). After U.V. induction, defective P14 bacteria lyse but only one bacterium in  $10^7$  releases infectious particles.

2° During the latent period following U.V. irradiation of defective P14, the phage genetic material multiplies in the same way as in normal lysogenic bacteria.

3° The defective character of P14 bacteria can be ascribed to a prophage lesion. The  $d_1$  locus, responsible for the defect, can be mapped by superinfecting U.V.-induced defective P14 with suitable mutant  $\lambda$  phages.

4° In the lysates of U.V.-induced defective P14, are found empty phage heads, similar to « doughnuts », as well as non-adsorbable, non-sedimentable serum-blocking antigens.

5° The  $d_1$  allele seems to prevent maturation of vegetative  $\lambda$  particles in a way similar to proflavin in the case of T2.

Moreover it appears that, in U.V.-induced P14, each vegetative particle is unable to perform a reaction necessary for its own maturation.

6° The study of defective lysogenic bacteria, whose prophage carries genes alleles which behave as lethal for phage reproduction or maturation, might be expected to bring information about the genetic and physiological determinism of phage morphogenesis.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 101.
- [2] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **231**, 1585.
- [3] A. LWOFF et L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1397.
- [4] E. M. LEDERBERG et J. LEDERBERG. *Genetics*, 1953, **38**, 51.
- [5] R. APPELYARD. *Genetics*, 1954, **39**, 440.
- [6] L. SIMINOVITCH. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1694.
- [7] F. JACOB et E. L. WOLLMAN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 724.
- [8] J. J. WEIGLÉ. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1953, **39**, 628 ; *Ibid.*, en préparation.
- [9] N. VISCONTI et M. DELBRUCK. *Genetics*, 1953, **38**, 5.
- [10] S. E. LURIA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1951, **16**, 463.
- [11] R. I. DE MARS, S. E. LURIA, H. FISHER et C. LEVINTHAL. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 113.
- [12] F. LANNI et Y. LANNI. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1953, **18**, 159.
- [13] R. APPELYARD. Sous presse.
- [14] A. NOVICK et L. SZILARD. *Science*, 1951, **113**, 34.
- [15] R. I. DE MARS. *Virology*, 1955, **1**, 83.
- [16] F. M. BURNET. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1933, **14**, 100.
- [17] R. A. FOSTER. *J. Bact.*, 1948, **56**, 795.

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

*Photographie des lysats de P14 au microscope électronique.*

A : suspension de particules vides de phages  $\lambda$ .

B : lysat de P14 induit par le rayonnement U. V.

Grossissement : 70 000  $\times$ . Examen fait à l'Institut de Physique de l'Université de Genève par E. Kellenberger.







# ÉTUDE RADIOBIOLOGIQUE DU SYSTÈME LYSOGÈNE D'*ESCHERICHIA COLI* K 12.

## I. — RAYONS X

par H. MARCOVICH (\*).

(Institut Pasteur.  
Service de Radiobiologie et Cancérologie)

En 1950, Lwoff, Siminovitch et Kjeldgaard [1] découvraient l'induction des bactéries lysogènes à produire des bactériophages par les rayons ultraviolets. L'année suivante, Latarjet [2] montrait que les rayons X sont doués de la même propriété.

Une première étude systématique de l'action des rayons X sur les bactéries lysogènes a été effectuée par Tobin sur *Pseudomonas pyocyanea* [3], d'où il ressort notamment que la période latente de l'induction par les rayons X est plus courte que celle de l'induction par les rayons ultraviolets.

Dans ce travail, on se propose d'étudier l'action des rayons X sur les bactéries lysogènes *Escherichia coli* K 12 ( $\lambda$ ), sur la souche sensible K 12 S et sur le phage  $\lambda$ , et d'analyser quantitativement les relations entre les diverses propriétés susceptibles d'être affectées par l'irradiation.

### MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

SOUCHES BACTÉRIENNES ET MILIEU DE CULTURE. — La souche lysogène utilisée ici est *Escherichia coli* K 12 ( $\lambda$ ) lysogène pour le bactériophage  $\lambda$ +, provenant du laboratoire du Dr Lwoff.

La souche sensible à  $\lambda$  + est *Escherichia coli* K 12 S résistante à la streptomycine, communiquée par le Dr Wollman.

Certaines expériences ont été effectuées à l'aide d'un mutant virulent,  $\lambda_v$ , du bactériophage tempéré, que nous a donné le Dr F. Jacob.

Les cultures sont effectuées dans du bouillon dont la composition est la suivante :

Difco-Tryptone Broth, 5 g ; Difco Nutrient Broth, 3 g ; ClNa, 5 g ; H<sub>2</sub>O redistillée sur Pyrex, qsp, 1 000 cm<sup>3</sup>.

Dans ce milieu, le temps de génération moyen des bactéries K 12 ( $\lambda$ ) et K 12 S est de vingt-huit minutes à 37°. Les cultures sont irradiées, sauf indication contraire, quand elles ont atteint la fin de la phase de croissance exponentielle, c'est-à-dire quand le nombre de bactéries

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1955.

est de  $3.10^9$  bactéries/cm<sup>3</sup>. Les étalements sont faits dans des boîtes de Petri contenant un milieu à 1,2 p. 100 de gélose dont la composition est la même que celle du bouillon additionné de 8 p. 1 000 de peptone UCLAF.

#### SOURCE DE RAYONS X.

La source de rayons X est un tube Holweck démontable à anti-cathode de molybdène fonctionnant sous 37 Kv. Le rayonnement filtré sur 0,05 mm d'aluminium a une longueur d'onde moyenne de 0,9 Å. L'intensité du courant qui alimente le filament peut être réglée entre 40 mA et 1,5 mA, ce qui permet de modifier en proportion le débit du rayonnement.

Sauf indication contraire, les irradiations sont effectuées sur des

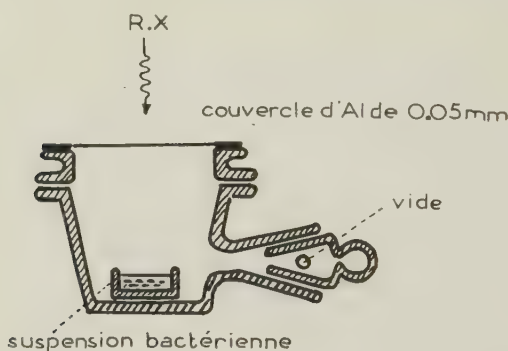


FIG. 1. — Boîte en Pyrex à couvercle d'aluminium dans laquelle on effectue le dégazage des suspensions à irradier.

suspensions bactériennes dans de l'eau physiologique additionnée de 20 p. 100 de bouillon. Les récipients sont soit des cuves en Pyrex de 20 mm de diamètre, soit de préférence des cuves taillées en verre de montre dans une plaque de plexiglass.

Pour rechercher l'influence de la tension d'oxygène (effet oxygène), 1,5 cm<sup>3</sup> de la suspension à irradier est mis dans une boîte en Pyrex, dont le couvercle est constitué par un anneau de verre rodé fermé par une feuille d'aluminium de 0,05 mm d'épaisseur. Un robinet permet d'y faire le vide (fig. 1).

L'opération de dégazage est effectuée lentement à la température du laboratoire et les échantillons sont maintenus pendant dix minutes en communication avec la pompe à vide, à la pression de  $10^{-3}$  atmosphère. La qualité du dégazage a été contrôlée à l'aide de la technique au sulfate ferreux.

#### RÉSULTATS.

I. *Survie de K 12 S.* — La survie à l'irradiation de la souche K 12 S non lysogène, mesurée par le nombre de bacté-



ries capables de former des colonies, est une fonction exponentielle de la dose (fig. 2 et 3). La pente de la courbe de survie est la même si la culture est irradiée en période de croissance

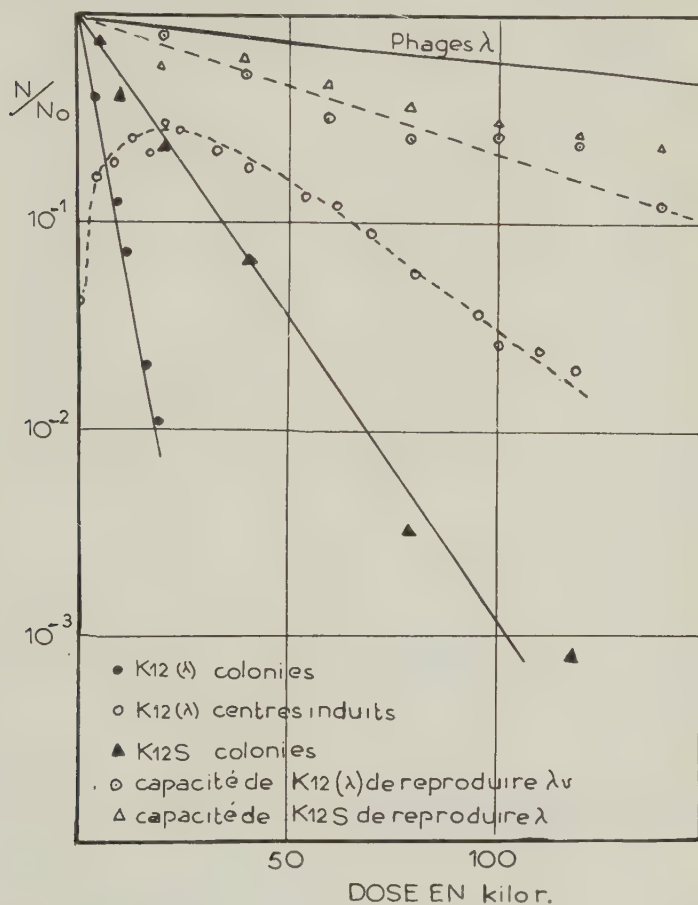


FIG. 2. — Une culture de vingt-quatre heures est réensemencée à raison de  $0,2 \text{ cm}^3$  dans  $10 \text{ cm}^3$  de bouillon tryptone. Après cinq heures de culture à  $37^\circ$ , on dilue à 1 p. 100 dans de l'eau physiologique additionnée de 20 p. 100 de bouillon. On prélève des échantillons de  $1,5 \text{ cm}^3$  que l'on irradie. On étale immédiatement après l'irradiation dans des boîtes de Petri, dans lesquelles on détermine le nombre de bactéries ayant conservé le pouvoir de former une colonie et celui des bactéries produisant des bactériophages. Pour étudier la capacité de K12 S, à reproduire le bactériophage, on irradie une suspension de bactéries, puis on l'infecte en bouillon à raison de 1 bactériophage pour 500 bactéries. On laisse adsorber pendant cinq minutes à  $37^\circ$ , on neutralise les bactériophages libres à l'aide d'un antisérum et on étale en présence de la souche indicatrice. La courbe de survie du bactériophage  $\lambda+$  est donnée à titre de comparaison.

exponentielle ou si elle a séjourné dix-huit heures à 37°, en phase stationnaire. Dans la figure 3, on voit que le caractère exponentiel de la relation dose-survie se vérifie jusqu'à une

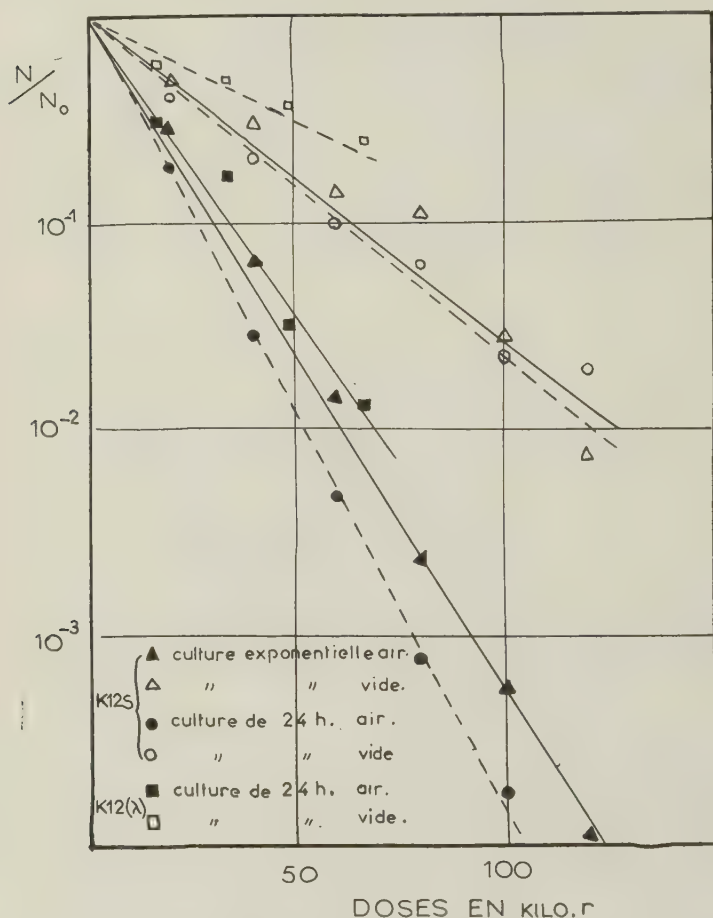


FIG. 3. — Courbe de survie de K12 S dans le vide et dans l'air ; cultures arrêtées et cultures en période exponentielle. Courbes de survie de K12 (λ) en phase stationnaire depuis dix-huit heures.

fraction de survivants égale à 1 p.  $10^4$  du nombre des bactéries irradiées. Cette relation a été trouvée valable jusqu'à des doses qui laissent moins de 1 p.  $10^7$  bactéries survivantes. Il est important de souligner que, même avec pareille dose, les bactéries

survivantes forment leurs colonies dans les mêmes délais que le témoin non irradié. Ceci contraste avec le résultat de l'action des rayons ultraviolets qui se manifeste, chez les bactéries survivant à l'irradiation, par un retard dans le développement des colonies, retard d'autant plus marqué que la dose est plus forte.

La radiosensibilité de la survie de K 12 S présente un effet oxygène (fig. 3.).

La dose de rayons X qui laisse une survie de 37 p. 100 est de 9 000 r dans l'air et de 18 000 r dans le vide.

II. *Survie de K 12 (λ).* — Comme la souche précédente, la souche lysogène K 12 (λ) est tuée par les rayons X selon une loi exponentielle (fig. 2 et 3). Sa radiosensibilité est cependant beaucoup plus grande. La dose correspondant à une survie de 37 p. 100 est de  $2,5 \cdot 10^3$  r dans l'air et de  $4,5 \cdot 10^3$  r dans le vide.

Quand on carence les bactéries l'inductibilité décroît considérablement [4]. Les courbes de survie se superposent alors à celles de K 12 S, tant pour les irradiations effectuées dans l'air que pour celles effectuées dans le vide.

III. *Courbe d'induction de K 12 (λ).* — Le nombre de bactéries qui sont induites à produire des phages dans une suspension soumise à des doses croissantes de rayons X subit l'évolution suivante : il commence par augmenter à partir de sa valeur spontanée, passe par un maximum qui se situe aux environs de 40 p. 100 du nombre total des bactéries traitées, puis décroît exponentiellement (fig. 2). L'étude détaillée de la portion ascendante de cette courbe (*Ann. Inst. Pasteur*, sous presse) montre que l'induction par les rayons X obéit à un processus à un coup. La dose qui correspond par extrapolation à 63 p. 100 d'induits théoriques est de  $1,5 \cdot 10^3$  r. Cette dose correspond également au sommet de la courbe d'induction.

L'ensemble de cette courbe n'est pas influencé par la tension d'oxygène réalisée dans la suspension au moment de l'irradiation (fig. 4).

IV. *Capacité de K 12 S et de K 12 (λ) de permettre la multiplication des phages λ+ et λv.* — Quand on irradie des bactéries sensibles et quand on les infecte avec des bactériophages, la proportion de celles qui sont capables d'assurer les synthèses des phages est d'autant moins grande que la dose est plus considérable. La relation dose-effet est, avec les rayons X, exponentielle, ainsi que le montre la figure 2. Cette capacité est la même pour le phage tempéré λ+ et pour son mutant virulent λv. Elle est la même si les bactéries sont irradiées en période exponentielle ou en phase stationnaire.

Puisque les bactéries lysogènes *E. coli* K 12 (λ) ne sont pas immunes à l'égard de λv, on peut, sur elles, étudier la radio-

sensibilité de la « capacité » d'assurer le développement de ce phage, et la comparer à celle de K 12 S d'une part, et à celle de K 12 ( $\lambda$ ) de permettre la synthèse des virus à partir du prophage induit, d'autre part.

On voit d'après la figure 2, que les courbes de « capacité »

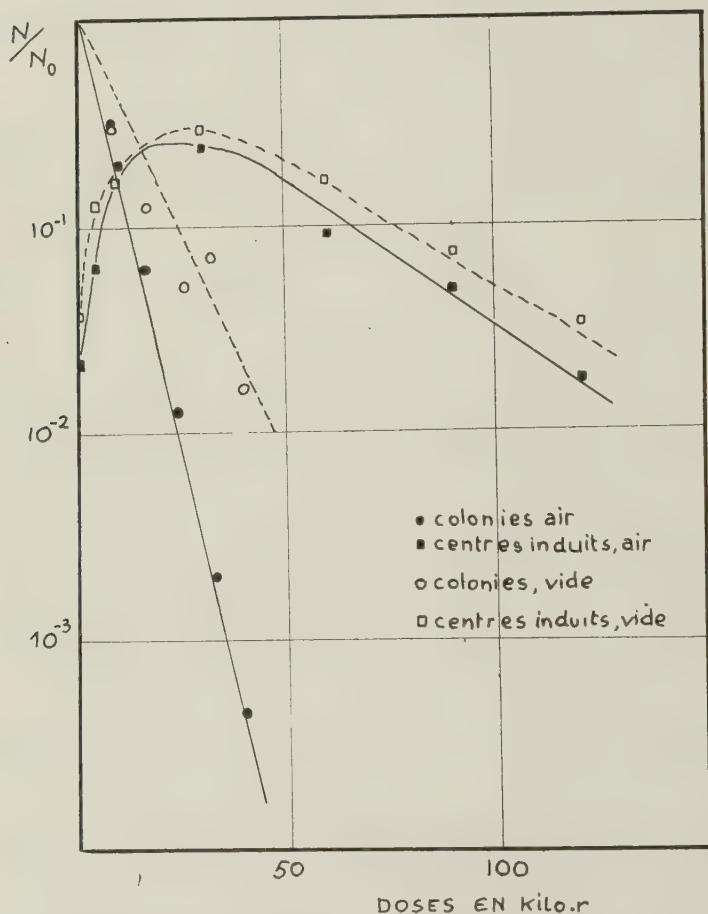


FIG. 4. — Courbes de survie et courbes d'induction de K 12 ( $\lambda$ ) dans l'air et dans le vide : les conditions expérimentales sont identiques à celles de la fig. 2.

sont les mêmes quand il s'agit d'infection. Ces courbes témoignent d'une radiosensibilité moins grande que celle de la « capacité » pour l'induction. Afin de déterminer si, dans ce dernier cas, la radiosensibilité supplémentaire n'était pas due à l'irra-



diation du matériel génétique du phage, des bactéries K 12 S ont été infectées avec  $\lambda+$  et irradiées dans les cinq minutes suivant l'infection. La « courbe de capacité » ne diffère pas de celle des bactéries irradiées seules.

La capacité des bactéries infectées, pas plus que celle des bactéries induites, ne présente d'effet oxygène.

Les doses utilisées dans ces expériences respectent pratiquement dans son intégrité la facilité d'adsorption des phages par les bactéries. En effet, une dose de 400 000 r ne permet pas de

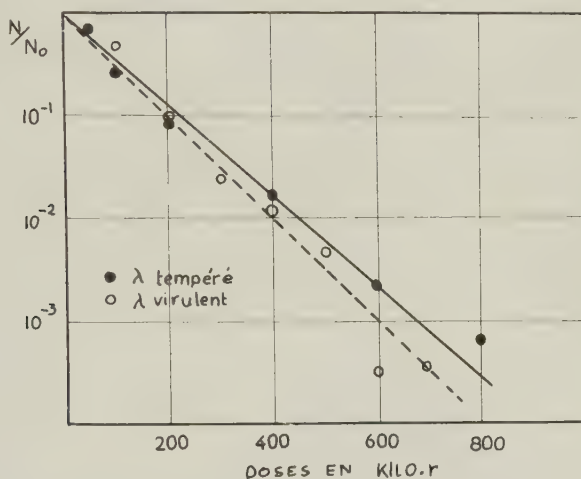


FIG. 5. — Courbes de survie du bactériophage tempéré  $\lambda+$  et de son mutant virulent  $\lambda v$ , irradiés en bouillon.

décélérer une modification de l'adsorption chez les bactéries irradiées par rapport aux bactéries témoins.

Ainsi qu'il ressort des résultats figure 2, des bactéries tuées par l'irradiation sont capables d'assurer la multiplication des phages infectieux et celle des phages issus de l'irradiation.

Ceci est en accord avec les résultats de Rouyer et Latarjet [5], d'Anderson [6], et de Benzer et Jacob [7], d'après lesquels la radiosensibilité des processus impliqués dans la division cellulaire est plus grande que celle des réactions de synthèse du phage.

V. *Survie du phage  $\lambda$*  (fig. 5). — La radiosensibilité de la survie du phage  $\lambda$  est relativement faible.

Elle est la même, aux erreurs expérimentales près, pour le phage tempéré ainsi que pour son mutant virulent  $\lambda v$ . (Selon Epstein et Englander,  $\lambda v$  serait un peu plus résistant que le phage tempéré [8].) La dose 37 p. 100 de survie est de 110 000 r.

VI. *Etude de la période latente.* — La période latente de K 12 S infecté par  $\lambda+$  est de quarante-cinq minutes (fig. 6). Elle est d'une constance remarquable, car elle n'est pas sensiblement modifiée si les bactéries sont préalablement irradiées avec des doses de 500 000 r, pour lesquelles moins de 1 p. 100 des bactéries sont capables de produire des bactériophages et où la probabilité de

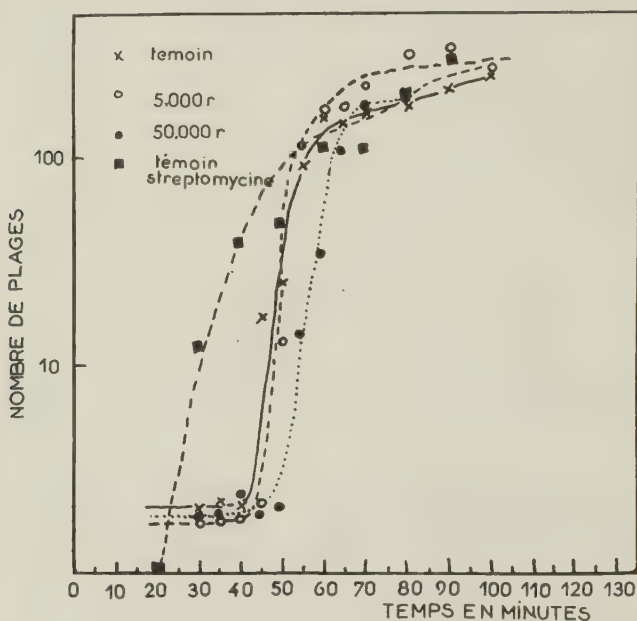


FIG. 6. — Une suspension de bactéries K 12 ( $\lambda$ ) est irradiée. On incube à 37° et on détermine à divers moments le nombre de centres infectieux. Parallèlement on étudie, à l'aide de streptomycine, l'apparition des premiers phages mûrs intrabactériens.

survie est  $1/10^{15}$ . Le rendement moyen est d'environ 150 phages par bactérie.

La durée de la période latente de K 12 ( $\lambda$ ) induit par les rayons X est de cinquante-cinq minutes. Elle est également très constante, puisqu'une dose de 250 000 r ne la modifie pas (fig. 7). Or, dans ces conditions, il n'y aurait pas une bactérie sur  $10^5$  capable d'assurer l'évolution du prophage en phage mûr et on ne saurait avoir plus de  $10^{-20}$  bactéries survivant à une telle dose. Chaque bactérie induite libre, en se lysant, 120 à 150 phages.

Dans tous les cas, le rendement n'est pas affecté par l'irradiation.

Ces résultats sont en contraste manifeste avec ceux que donnent les rayons ultraviolets, lesquels, à mesure que la dose augmente,

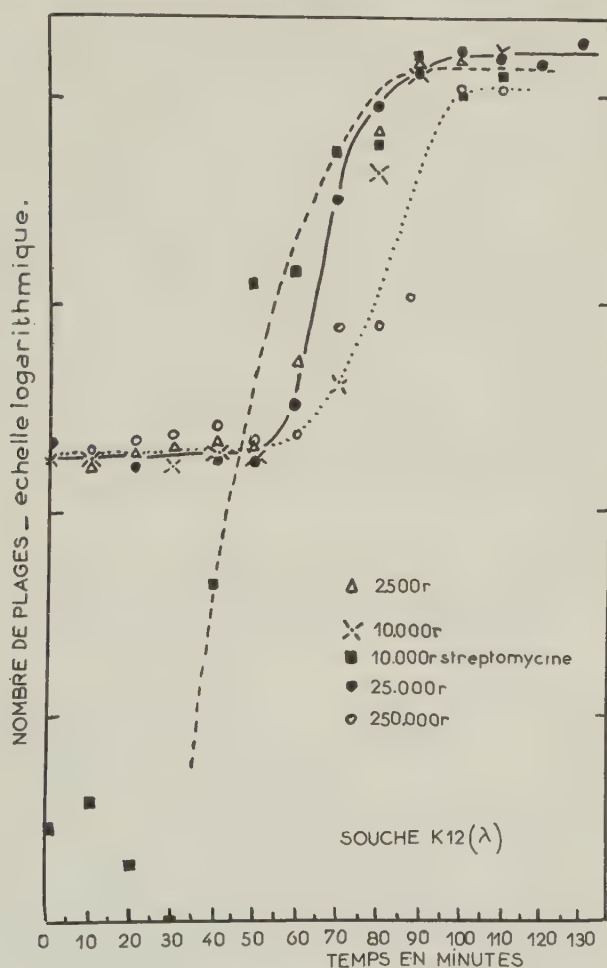


FIG. 7. — Des bactéries K 12 sont infectées à l'aide de phages  $\lambda$  + On adsorbe deux minutes à 37°, puis on inactive le phage libre à l'aide d'un anti-sérum. On dilue et on étale à divers moments sur la souche sensible. La courbe en pointillés concerne la mise en évidence de phages mûrs intracellulaires.

allongent la latence et diminuent le rendement moyen des bactéries.

VII. *Etude de l'évolution des bactériophages mûrs intrabactériens.* — Doermann a montré que des bactériophages ayant infecté

une bactérie subissent une éclipse pendant la première moitié de la période latente [9]. Chez les bactéries induites par les rayons ultraviolets, il en est de même. Dans ces études, on utilise le cyanure de potassium qui bloque les synthèses bactériennes et entraîne la lyse précoce des bactéries contenant des phages mûrs.

Le cyanuré de potassium a été essayé pour étudier l'évolution intrabactérienne du nombre des bactériophages infectieux, après l'induction par les rayons X. Contrairement à ce qui se passe avec les rayons ultraviolets, les résultats sont variables d'une expérience à l'autre. Au cours de ce travail, il s'est avéré que la streptomycine et, d'une façon plus générale, toutes les substances toxiques (formol, acide osmique, chloroforme), essayées dans un but différent, possèdent la propriété de tuer les bactéries et de provoquer la libération des bactériophages dans le milieu de culture, avant la fin de la période latente.

Dans la figure 8 sont tracées les courbes de variation de l'opacité d'une culture induite par une dose de 20 000 r. De la streptomycine est ajoutée à divers moments de la période latente. On voit que la lyse est plus précoce et d'autant plus prononcée que l'antibiotique est introduit plus près de la fin de cette période.

La streptomycine donne des résultats entièrement superposables à ceux du cyanure de potassium, chez les bactéries induites par les rayons ultraviolets. Par contre, ces résultats sont bien plus constants avec les bactéries induites par les rayons X.

La technique utilisée ici est analogue à celle décrite par Doermann. La concentration en streptomycine peut varier entre 20  $\gamma$  et 2 000  $\gamma/\text{cm}^3$ , sans modifier le résultat. On voit d'après les figures 6 et 7 que les premiers phages mûrs intrabactériens apparaissent chez les bactéries infectées et chez les bactéries induites, près de quinze minutes avant l'expiration de la période latente. Le même résultat s'observe avec les bactéries induites par les rayons ultraviolets, dont la période latente est de soixante-cinq minutes. On peut donc conclure avec les rayons X comme avec les U. V., que l'évolution du prophage comporte une période de transition par laquelle les phages infectieux ne passent pas [10].

La streptomycine, pas plus qu'elle ne tue les bactéries streptomycino-résistantes, ne modifie l'évolution de la période latente de celles qui sont induites. La lyse se poursuit chez elles, comme dans les témoins sans antibiotiques.

VIII. *Induction par les rayons X et photorestauration.* — L'induction de *Pseudomonas pyocyanea* par les rayons ultraviolets est reversée par la lumière visible de courte longueur d'onde [11].

Le même phénomène s'observe chez K 12 ( $\lambda$ ); cependant aucune restauration n'est mise en évidence si l'agent inducteur est un rayonnement X (Latarjet et Marcovich, résultats inédits).



La lumière visible, administrée à doses suffisantes, empêche la synthèse des phages d'aboutir chez les bactéries induites et supprime leur lyse. L'opacité de la culture irradiée, puis illuminée, ne baisse pas, contrairement à celle de la culture n'ayant

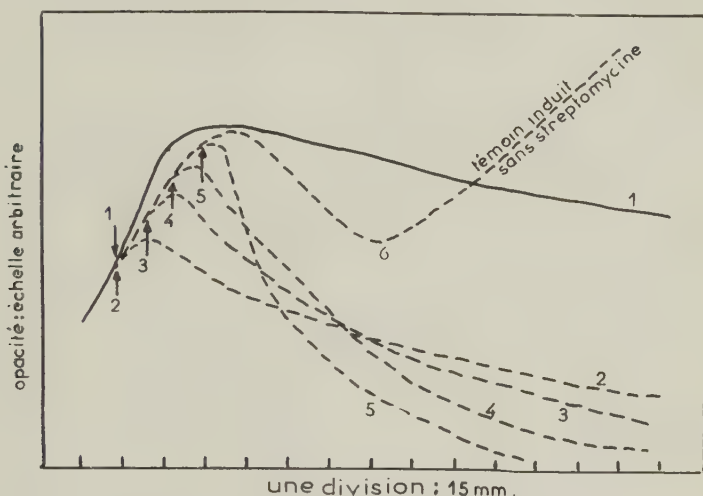


FIG. 8. — Courbes de lyse photométrique de K 12 ( $\lambda$ ) induite par 15 000 r, en présence de streptomycine ajoutée à divers moments.

pas reçu de lumière. C'est ce qui a pu faire croire à l'existence d'une photorestauration [12].

### DISCUSSION.

I. — Les relations dose-effet trouvées dans l'étude ci-dessus sont toutes des exponentielles. Les courbes de survie de K 12 S, de K 12 ( $\lambda$ ), en ce qui concerne leur pouvoir de division, la survie de la capacité de reproduire des phages infectants, sont en coordonnées semi-logarithmiques des droites passant par l'origine des coordonnées. Ces résultats s'observent dans les conditions de milieux et de croissance les plus diverses, ils témoignent de l'homogénéité de la population bactérienne. Cette homogénéité concerne en particulier la radiosensibilité des diverses phases du cycle de division des bactéries. En effet, s'il en était autrement, s'il existait dans ce cycle une partie plus radiosensible, ce fait se traduirait pour une population bactérienne en croissance par une relation dose-effet non exponentielle. La courbe représentative

serait formée par une première portion à grande pente suivie d'une seconde portion de pente plus faible.

II. — Dans le tableau I sont inscrites, pour les propriétés étudiées ici, les doses qui produisent une « atteinte » de 63 p. 100, c'est-à-dire les doses qui produiraient un événement par bactérie en moyenne, en supposant ces événements distribués selon une série de Poisson.

TABLEAU I.

Propriété -----		Dose 63 % en r x 1.000 -----
K 12 ( $\lambda$ ) (survie)	air )	2,5
	vide)	4,5
Induction (Ces Annales, sous presse)	air )	15
	vide)	
Inactivation de la capacité de K 12 ( $\lambda$ ) induit	air )	25
	vide)	
K 12S (survie)	air )	9
	vide)	18
Capacité de K 12S pour $\lambda_+$ , $\lambda_v$ et de K 12 ( $\lambda$ ) inductible ou non pour $\lambda_v$	air)	65
	vide)	
$\lambda_+$ et $\lambda_v$ (survie)	air )	120
	vide)	

On sait que, quand on lysogénise une bactérie de la souche sensible K 12 S, on accroît sa radiosensibilité dans laquelle à l'action létale « de base » s'ajoute celle qui résulte de l'induction. Il semble bien en être ainsi puisque dans la figure 3 on voit que la radiosensibilité d'une souche lysogène non inductible est la même que la radiosensibilité de la souche non lysogène.

La probabilité  $1 - e^{-\alpha D}$  de tuer une bactérie K 12 ( $\lambda$ ) avec une dose D de rayons X peut être mise sous la forme

$$1 - e^{-\alpha D} = 1 - e^{-\beta D} + 1 e^{-\gamma D} - (1 - e^{-\beta D}) (1 - e^{-\gamma D}) + \varphi(D) \quad (1)$$

où  $\beta$  caractérise la radiosensibilité de la survie de K 12 S,  $\gamma$  celle de l'induction mesurée par le nombre de bactéries qui forment des plages sur la souche sensible.  $\varphi(D)$  est une fonction de la dose qui doit être nulle si chaque bactérie induite produit des

phages mûrs. Dans un tel cas, la probabilité de survie d'une bactérie de K 12 ( $\lambda$ ) serait

$$e^{-\alpha D} = e^{(-\beta + \gamma) D} \quad (2)$$

d'où

$$\alpha = \beta + \gamma. \quad (3)$$

Cette dernière relation n'est pas validée par les données du tableau I car on a  $\alpha > \beta + \gamma$ . Un certain nombre de bactéries, en raison de leur inductibilité, sont donc l'objet d'une atteinte létale sans produire de bactériophage. Un effet de cette sorte a déjà été décrit chez *E. coli* K 12 par Latarjet et Miletic [13], qui l'ont désigné sous le nom d'induction abortive. La grandeur qu'il faut ajouter au deuxième membre de l'équation (3) correspond à une dose de 63 p. 100 d'induction de 4 500 r dans l'air et de 14 000 r dans le vide.

Deux réponses des bactéries inductibles sont ainsi mises en évidence, selon qu'elles sont influencées ou non par la tension d'oxygène.

1° Des inductions abortives sensibles à la pression de ce gaz. Elles pourraient, par exemple, être le résultat de la production de peroxydes ou de radicaux  $\text{HO}_2$  au niveau du système moléculaire auquel est lié le développement du prophage.

2° Des inductions productives insensibles à ce facteur, dont l'avortement, comme en témoigne la portion descendante de la courbe d'induction, n'est pas, lui non plus, influencé par la pression d'oxygène.

On peut interpréter la forme de la courbe d'induction de deux manières :

1° Deux événements distincts sont à même de survenir dans une bactérie inductible. L'un est le déclenchement des processus qui font entrer le prophage dans la phase végétative. L'autre serait l'endommagement de la capacité de la bactérie induite de mener à leur terme les synthèses des phages mûrs.

La formule de cette courbe serait alors :

$$\frac{N}{N_0} = (1 - e^{-\gamma D}) e^{-kD}$$

où  $\frac{N}{N_0}$  est la fraction des bactéries irradiées par une dose  $D$  produisant des bactériophages, et où  $\gamma$  et  $k$  dépendent respectivement de la survenue de l'induction et de son inactivation. Dans une telle hypothèse, l'on admet que le système moléculaire dont dépend l'induction s'active de la même manière, quel que soit le nombre d'événements dont il est le siège.

2° On peut penser que ce système activé par un événement unique est détruit s'il s'en produit plus d'un. Chimiquement, ceci

est concevable ; il pourrait s'agir par exemple de plusieurs niveaux successifs d'oxydation ou de réduction d'une molécule, dont seul le premier serait compatible avec une induction productive. La courbe d'induction aurait pour formule :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\gamma D} \gamma D \quad (4)$$

deuxième terme de la série de Poisson.

On voit sur la figure 9 que la courbe représentative de l'équation (4) est en bon accord avec les résultats expérimentaux. Pour

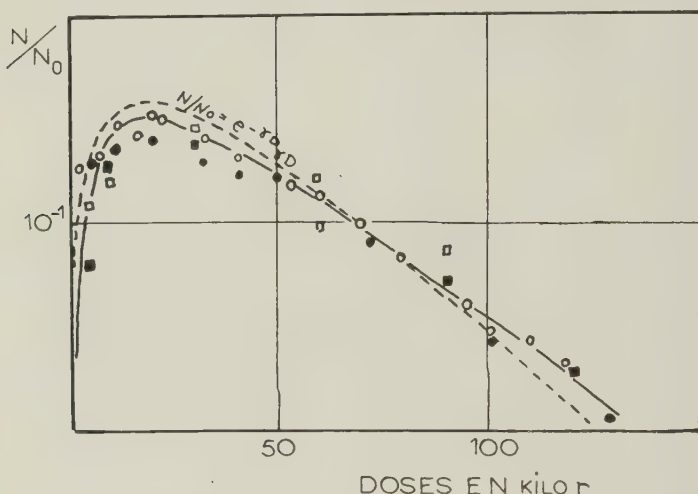


FIG. 9. — Comparaison de la courbe théorique  $\frac{N}{N_0} = e^{-\gamma D} \gamma D$  avec la courbe de régression ajustée sur les points expérimentaux de courbes d'induction obtenues au cours de diverses expériences indépendantes.

suggestif que soit cet accord, l'hypothèse soulevée ici n'en reste pas moins aléatoire.

III. — La période latente des bactéries infectées est de quarante-cinq minutes contre 55 pour les bactéries induites par les rayons X et 65 pour celles induites par les rayons U. V. Dans ces trois cas, les premiers phages mûrs intrabactériens apparaissent une quinzaine de minutes avant la lyse. Une différence analogue a été constatée chez *Pseudomonas pyocyanea* par Tobin avec les rayons X (*loc. cit.*) et par Jacob avec l'ypérite [14].

Elle fut interprétée comme étant l'indice de ce que les rayons X induisent en sautant une étape, par laquelle doivent passer les inductions par les rayons ultra-violet.



L'analyse intracellulaire, au cours de la période latente des bactéries induites par ces deux types de rayonnements, est en accord avec cette interprétation.

IV. — Nous avons vu que la durée de la période latente, ainsi que le rendement moyen en bactériophages n'étaient pas sensiblement modifiés par des changements considérables des doses, tant chez les bactéries lysogènes induites par les rayons X, que chez les bactéries sensibles, irradiées avant d'être infectées. En outre, il a été dit plus haut, que pour les doses élevées, si fortes soient-elles, les colonies formées par les bactéries survivantes apparaissent dans les mêmes délais que celles du témoin non irradié. Pareil fait ne s'observe pas avec les rayons ultraviolets.

Les rayons X semblent agir en quelque sorte par un effet de tout ou rien. Quand une bactérie survit à une irradiation, quand les processus qui conduisent à la production de bactériophages peuvent se dérouler, tout se passe comme si tous les éléments qui sont intéressés dans leur aboutissement étaient inaltérés. Les rayons X produisent des ionisations, lesquelles, si elles surviennent dans un système moléculaire, suffisent à le détruire et à entraver totalement la fonction qui en dépend. Avec les excitations produites par les rayons ultraviolets, des lésions moins définitives pourraient se produire et n'entraver que momentanément le déroulement des réactions. Ces considérations sont en accord avec l'existence d'une restauration par la lumière visible et par la catalase [15] chez les bactéries irradiées par les ultraviolets et son absence chez celles exposées aux rayons X.

#### L'EFFET OXYGÈNE.

La population bactérienne étant homogène, aussi bien en ce qui concerne la radiosensibilité du pouvoir de division que celle de l'induction, on peut conclure qu'une même bactérie possède deux caractères dont l'un présente l'effet oxygène et l'autre pas.

Un exemple analogue a été décrit par Anderson [16]. Il s'agit de deux mutations métaboliques d'une souche d'*Escherichia coli*, qui a besoin de streptomycine et d'histidine pour croître. La fréquence des mutations vers l'indépendance à l'égard de ces deux substances est accrue par les rayons X. Seule la mutation histidine (—) → (+) présente un effet oxygène.

Les exemples d'absence d'effet oxygène sont rares. Nous avons vu celui de l'inactivation de  $\lambda$  + par les rayons X. Récemment, Ephrussi-Taylor et Latarjet ont montré qu'il en était de même pour le principe transformant du pneumocoque [17].

On sait que l'effet oxygène ne croît pas indéfiniment. Il existe une pression limite au-dessus de laquelle la sensibilité du matériel irradié n'augmente pas [18, 19]. Etant donnée l'efficacité

moins grande avec laquelle on peut effectuer la désoxygénation dans une cellule par rapport aux solutions chimiques simples, on ne peut exclure que les systèmes biologiques, qui ne présentent pas d'effet oxygène, soient en réalité des systèmes à pression limite basse.

Le mécanisme de l'effet oxygène est des plus mal connus. La nature des radicaux formés avec ou sans oxygène est hypothétique.

Il serait hasardeux pour l'instant d'y chercher des renseignements sur le mécanisme chimique des premières étapes de l'induction.

#### RÉSUMÉ.

1° Les courbes de survie des bactéries lysogènes *Escherichia coli* K 12 ( $\lambda$ ) et des bactéries sensibles K 12 S ont été étudiées, ainsi que celles du phage tempéré  $\lambda+$  et de son mutant virulent  $\lambda v$ .

2° Les courbes d'inductions de K 12 ( $\lambda$ ) ont été déterminées dans l'air et dans le vide. Elles montrent l'absence d'un effet oxygène.

3° La radiosensibilité de K 12 ( $\lambda$ ) supérieure à celle de K 12 S peut s'expliquer par l'existence d'inductions abortives, létales pour les bactéries, associées aux inductions productives de phages.

4° Les périodes latentes de K 12 S infecté et de K 12 ( $\lambda$ ) induit ont été étudiées.

5° L'induction de K 12 ( $\lambda$ ) par les rayons X n'est pas photo-restaurable.

Je tiens à remercier M. R. Latarjet pour les suggestions qu'il m'a faites au cours de ce travail, et pour les critiques auxquelles il a soumis les idées dans ce mémoire. Je remercie également M. P. Morenne qui a effectué les irradiations et déterminé les doses de rayons X utilisées ici, ainsi que M<sup>lle</sup> R. Vayne pour son assistance technique.

#### SUMMARY.

1° The growth-curves of the lysogenic bacteria *Escherichia coli* K 12 ( $\lambda$ ) and of the sensitive K 12 S have been studied as well as those of the temperate phage  $\lambda+$  and its virulent mutant  $\lambda v$ .

2° The induction curves of K 12 ( $\lambda$ ) have been determined in the atmosphere and in vacuum. These show the absence of oxygen-effect.

3° The radiation sensitivity of K 12 ( $\lambda$ ) superior to that of K 12 S can be explained by the existence of abortive inductions, lethal

for the bacteria. associated with the productive inductions of phages.

4° The latent periods of infected K 12 S and of induced K 12 ( $\lambda$ ) have been studied.

5° The induction of K 12 ( $\lambda$ ) by X-rays is not photo-restorable.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LWOFF, L. SIMINOVITCH et N. KJELDGAARD. *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 815.
- [2] R. LATARJET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 389.
- [3] J. O. H. TOBIN. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 635.
- [4] F. JACOB. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 578.
- [5] M. ROUYER et R. LATARJET. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 89.
- [6] T. F. ANDERSON. *J. Bact.*, 1948, **56**, 403.
- [7] S. BENZER et F. JACOB. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 186.
- [8] M. T. EPSTEIN et S. W. ENGLANDER. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **52**, 394.
- [9] A. H. DOERMANN. *J. gen. Phys.*, 1952, **35**, 645.
- [10] F. JACOB. *Thèse Fac. Sci.*, Paris, 1954.
- [11] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **231**, 1885.
- [12] R. LATARJET. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 1713.
- [13] R. LATARJET et B. MILETIC. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 205.
- [14] F. JACOB. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2238.
- [15] R. LATARJET et L. R. CALDAS. *J. gen. Phys.*, 1952, **35**, 455.
- [16] E. H. ANDERSON. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1951, **37**, 340.
- [17] H. EPHRUSSI-TAYLOR et R. LATARJET. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **35**, 183.
- [18] L. H. GRAY. *Acta Radiologica*, 1954, **41**, 63.
- [19] N. H. GILES. *Symposium on Radiology*, 1950, 267-284, Oberlin College, John Wiley and Sons, New-York, édit.

# ÉTUDE DU MÉTABOLISME DE LA LEVURE DE BOULANGERIE A L'AIDE DE GLUCOSE ET D'ÉTHANOL RADIOACTIFS

par J.-P. AUBERT et G. MILHAUD (\*)

(Institut Pasteur, Laboratoire des Isotopes)

Nous avons utilisé le glucose et l'éthanol marqués pour étudier dans la levure de boulangerie intacte le devenir de ces métabolites en précisant :

1° La nature des différents intermédiaires formés à partir du glucose.

2° L'influence des conditions d'aération sur l'importance relative de ces intermédiaires.

3° La nature des différents intermédiaires formés à partir de l'éthanol.

4° Le mécanisme de formation de certains composés à partir de l'éthanol.

5° La cinétique de l'incorporation de la radioactivité dans certains composés.

## TECHNIQUES GÉNÉRALES.

La levure utilisée est une souche diploïde de *Saccharomyces cerevisiae* qui est cultivée en aérobiose sur eau de touraillons glucosée (touraillons : 30 g par litre ; glucose : 100 g). Avant l'épuisement du glucose, les cellules sont centrifugées, puis lavées deux fois à l'eau bidistillée. Une suspension dans du tampon phosphate 0,025 M à pH 6,0 est mise ensuite à incuber à 30°, en présence d'un substrat déterminé, dans une fiole de Warburg. A la fin de l'expérience, les cellules sont lavées très rapidement à l'eau glacée puis extraites pendant une minute avec 1 ml d'alcool à 80 p. 100 bouillant. L'extrait est concentré, puis soumis à une chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 4 lavé à l'acide oxalique, dans les systèmes de solvants suivants : phénol saturé d'eau, acide propionique-N-butanol-eau (1-2-1,4). On procède ensuite à la radioautographie.

Le glucose-<sup>14</sup>C, uniformément marqué (50  $\mu$ C/mg), a été préparé

(\*) Manuscrit reçu le 20 octobre 1955.

au laboratoire par photosynthèse, sa pureté en substance radioactive est supérieure à 99,9 p. 100. L'éthanol-1,2- $^{14}\text{C}$  (57  $\mu\text{C}/\text{mg}$ ) a été préparé au laboratoire par fermentation alcoolique à partir du fructose  $^{14}\text{C}$  obtenu également par photosynthèse (42  $\mu\text{C}/\text{mg}$ ) et l'éthanol-2- $^{14}\text{C}$  à partir du glucose-1- $^{14}\text{C}$  de Harwell.

Les techniques particulières sont rapportées dans chaque chapitre.

Toutes les mesures de radioactivité sont faites au compteur de Geiger (1  $\mu\text{C}$  donnant 150 000 coups/min).

## RÉSULTATS.

I. MÉTABOLISME DU GLUCOSE. — Dans une expérience type, on met dans une fiole de Warburg : 1 ml de suspension de levures (poids sec : 3 mg) dans du tampon phosphate 0,050 M pH 6,0, 10  $\mu\text{l}$  de solution de glucose radioactif (10  $\mu\text{C}$ -200  $\mu\text{g}$ ), 1 ml d'eau. Au centre, 0,1 ml KOH 1/3.

Lorsqu'après trente minutes d'incubation à 30° dans l'air, les 3/4 environ du glucose sont consommés, l'expérience est arrêtée. La figure 1 représente un radioautogramme correspondant à 1 mg de levure.

A. IDENTIFICATION DES COMPOSÉS FORMÉS [1]. — Nous avons caractérisé les corps suivants : fructose-diphosphate, glucose-phosphate, mannose - phosphate, uridine - diphosphate - glucose-galactose-mannose, méso-inositol-phosphate, sédoheptulose-phosphate ; acides diphosphoglycérique, 3-phosphoglycérique, phosphoénolpyruvique, citrique, malique, fumarique, lactique, aspartique, glutamique ; valine, leucine, norleucine, isoleucine et thréhalose.

Les identifications ont été faites avec les composés provenant directement du chromatogramme ou avec les produits dérivant de ces composés après réactions chimiques ou enzymatiques, en les soumettant à la cochromatographie [2] ou à la cocrystallisation avec des substances de référence non radioactives.

a) *Substances identifiées directement par cochromatographie.* — Acides : citrique, malique, fumarique, lactique ; acides aminés : aspartique, glutamique, glutamine, valine, leucine, norleucine, isoleucine. Les systèmes de solvants employés pour la chromatographie bidimensionnelle étant soit : phénol saturé d'eau et N-butanol-acide propionique-eau soit : phénol saturé d'eau et collidine-lutidine-eau (1-1-1), soit butanol tertiaire-méthyléthyl-cétone-eau (2-2-1) et butanol tertiaire-méthanol-eau (4-5-1) [3].

b) *Substances identifiées par cochromatographie après traitement à la polidase S.* — Après élution et concentration sous azote, la substance radioactive est soumise à l'action déphosphorylante



de 100  $\mu\text{g}$  de polidase S pendant quarante-huit heures à 37° sous toluène. Le reste carboné est ensuite identifié par cochromatographie et, dans certains cas, pour confirmation, le produit phosphorylé est lui-même identifié directement par cochromatographie. Ce fut le cas des corps suivants : fructose-1-6-diphosphate, glucose-phosphate, mannose-phosphate, méso-inositol-phosphate, acides diphosphoglycérique et 3-phosphoglycérique.

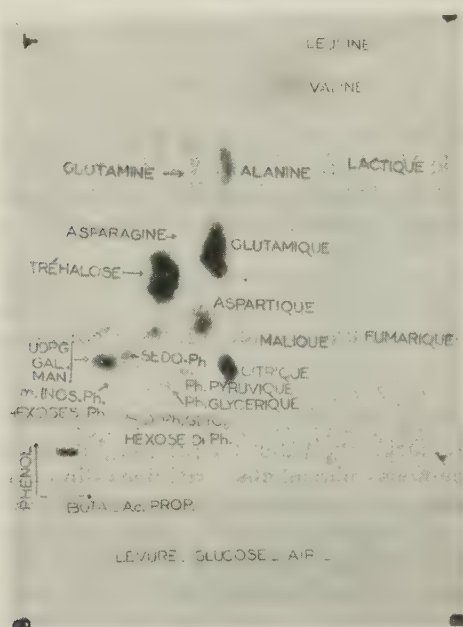


FIG. 1. — Analyse radioautographique de l'utilisation du glucose radioactif par la levure.

c) *Uridine-diphosphate-glucose-galactose-mannose*. — Après traitement à la polidase S, la tache radioactive donne naissance à 6 nouveaux composés dont 4 sont identifiables par cochromatographie au glucose, au mannose, au ribose et à l'uridine ; les 2 autres taches par leurs  $R_F$  correspondent sans doute à des oses phosphorylées cycliques [4]. Après hydrolyse dans l'acide chlorhydrique-N pendant une heure, ces composés donnent naissance à des résidus carbonés identifiables au glucose et au galactose.

d) *Sédoheptulose-phosphate*. — Après traitement à la polidase S, le résidu carboné coïncide par cochromatographie avec le sédoheptulose. D'autre part, ce résidu carboné, chauffé pendant une heure au bain-marie bouillant en solution aqueuse en présence

de Dowex 50 sous forme acide, donne naissance à deux composés qui sont identifiés par cochromatographie au sédoheptulose et au sédoheptulosane.

e) *Acide phosphoénolpyruvique*. — Le produit radioactif coïncide par cochromatographie avec la tache de l'acide phosphoénolpyruvique synthétique. D'autre part, si on soumet le composé radioactif à une hydrolyse en milieu chlorhydrique-N, en présence de 5 mg de pyruvate de Na et de 11 mg de dinitrophénylhydrazine, on obtient la dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique dont la radioactivité spécifique (148 coups/min./mg) demeure constante après recristallisation dans le nitrobenzène.

f) *Tréhalose*. — Le produit radioactif, hydrolysé dans l'acide chlorhydrique-N pendant une heure, donne naissance quantitativement à du glucose identifié par cochromatographie. D'autre part, ce composé peut être identifié directement par cochromatographie avec le tréhalose. Enfin par cocrystallisation dans l'eau-alcool en présence de tréhalose entraîneur, on obtient une radioactivité qui demeure constante au cours de trois recristallisations.

Le tableau I indique l'incorporation relative de la radioactivité dans les différents composés.

TABLEAU I. — Pour 100 de la radioactivité totale présente sur le chromatogramme.

Fructose 1-6 diphosphate. . . . .	0,25	Acide malique . . . . .	0,7
Hexoses monophosphates . . . . .	0,5	Acide fumarique . . . . .	0,01
Méso-inositol phosphate . . . . .	1,0	Acide aspartique . . . . .	3,7
Sédoheptulose phosphate. . . . .	3,5	Acide glutamique. . . . .	28,0
Uridine diph. gluc. gal. man. . . . .	3,8	Alanine . . . . .	5,0
Acide diphosphoglycérique. . . . .	0,25	Valine . . . . .	1,6
Acide 3-phosphoglycérique. . . . .	2,2	Leucine, isoleucine, norleucine. . . . .	2,2
Acide phosphoénolpyruvique. . . . .	1,2	Glutamine. . . . .	1,8
Acide lactique . . . . .	1,0	Tréhalose. . . . .	36,0
Acide citrique . . . . .	6,2		

B. INFLUENCE DES CONDITIONS D'AÉRATION. — La technique est identique à celle décrite ci-dessus, l'air est simplement remplacé par l'azote et la tubulure centrale contient une solution de pyrogallol dans la potasse. L'expérience est arrêtée quand les 3/4 environ du glucose sont consommés.

Les chromatogrammes ne présentent pratiquement pas de différences qualitatives, que la levure soit mise en aérobiose ou en

TABLEAU II. — Pour 100 de la radioactivité extraite.

	TRÉHALOSE	AC. GLUTAM.	ALANINE	VALINE	AC. LACTIQ.	AC. CITR.
Aérobiose. . .	36	28	5,0	1,6	1,0	6,2
Anaérobiose . .	14	4	32	20	13	2

anaérobiose ; en revanche, les différences quantitatives sont importantes. Ainsi, près de 80 p. 100 de la radioactivité extraite sont incorporés dans les corps suivants (V. tableau II).

II. MÉTABOLISME DE L'ALCOOL. — Dans une expérience type, on met dans une fiole de Warburg : 1 ml d'une suspension de levures cultivées sur eau de touraillons glucosée (poids sec, 3 mg) dans du tampon phosphate 0,05 M pH 6,0, 10  $\mu$ C alcool (176  $\mu$ g), 1 ml eau. Au centre, 0,1 ml KOH, 1/3.

L'expérience est arrêtée après une heure trente d'incubation à 30° dans l'air, lorsque la moitié environ de l'alcool est métabolisée.

A. *Identification des composés formés* [5]. — En employant les techniques que nous avons décrites précédemment, parmi les produits formés nous avons identifié : le glucose-phosphate, le mannose-phosphate, l'acide diphosphoglycérique, l'acide 3-phosphoglycérique, l'acide phosphoénolpyruvique, l'uridine-diphosphate-glucose-galactose-mannose, le sédoheptulose-phosphate, l'acide citrique, l'acide fumarique, l'acide lactique, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la glutamine, l'asparagine, l'alanine, la valine, la leucine et le tréhalose.

Le tableau III indique l'incorporation relative de la radioactivité dans les différents composés.

TABLEAU III. — Pour 100 de la radioactivité totale présente sur le chromatogramme.

Hexose-monophosphate . . . . .	0,3	Acide aspartique . . . . .	14,0
Sédoheptulose phosphate . . . . .	0,5	Acide glutamique . . . . .	43,4
Uridine diph. gluc. gal. man. . . . .	1,5	Alanine . . . . .	2,1
Acide 3-phosphoglycérique . . . . .	1,0	Valine . . . . .	1,0
Acide pho-phoénolpyruvique . . . . .	0,4	Leucine . . . . .	0,8
Acide lactique . . . . .	0,7	Glutamine . . . . .	3,6
Acide citrique . . . . .	16,6	Asparagine . . . . .	0,9
Acide malique . . . . .	2,0	Tréhalose . . . . .	9,4
Acide fumarique . . . . .	0,4		

B. *Métabolisme de l'éthanol en présence de glucose* [5]. — On sait qu'il est extrêmement difficile, sinon impossible d'empêcher la levure de former de l'alcool à partir du glucose, le seul moyen efficace étant, dans de bonnes conditions d'aération, de diminuer très fortement la concentration en glucose [6]. La question se pose donc de savoir si, dans les conditions habituelles, la levure métabolise ou non l'alcool qu'elle forme. L'emploi de l'éthanol radioactif permet d'y répondre.

Dans une fiole de Warburg, on met à incuber à 30° dans l'air, 3 mg de levures dans 2 ml de tampon phosphate 0,025 M en présence de 5,2  $\mu$ M de glucose ordinaire et de 5  $\mu$ M d'éthanol-1,2-<sup>14</sup>C (5  $\mu$ C). Après vingt-cinq minutes les analyses montrent

une consommation de  $3,6 \mu\text{M}$  d' $\text{O}_2$ ,  $3,7 \mu\text{M}$  de glucose et une formation de  $0,1 \mu\text{C}$  de  $\text{CO}_2$  radioactif.

L'alcool est donc parfaitement métabolisé en présence de glucose. Or, dans ces conditions, sachant que les  $2/3$  environ du glucose métabolisé sont transformés en alcool [6], on peut avoir une idée approximative de la quantité d'alcool métabolisée. S'il n'y avait pas eu consommation d'alcool, la quantité totale serait environ de  $10 \mu\text{M}$ . En admettant une oxydation totale de l'alcool, la quantité oxydée serait comprise entre  $0,05$  et  $0,1 \mu\text{M}$ . Comme d'autre part les cellules contiennent  $0,12 \mu\text{C}$  de radioactivité incorporée, on peut conclure qu'environ  $0,2 \mu\text{M}$  d'alcool ont été métabolisées.

La radioautographie montre, dans ce cas, une concentration de la radioactivité dans les corps du cycle citrique et de ses dérivés : acide glutamique : 60 p. 100 ; glutamine : 10 p. 100 ; acide citrique : 10 p. 100 ; acide aspartique : 2 p. 100 ; acide malique : 2 p. 100. On n'observe la présence d'aucun corps se rattachant à la glycolyse ni la formation de tréhalose.

*C. Incorporation de la radioactivité dans certains composés de la glycolyse* [7]. — Pour étudier le mécanisme de synthèse des corps de la glycolyse à partir de l'éthanol, nous avons employé de l'éthanol- $2\text{-}^{14}\text{C}$  et dosé la radioactivité présente dans chacun des atomes de carbone du tréhalose, de l'acide 3-phosphoglycérique, de l'acide phosphoénolpyruvique et de l'alanine.

Avant d'être soumis à la dégradation, le tréhalose est hydrolysé en glucose ( $\text{ClH1N}$ , deux heures à  $100^\circ$ ), l'acide 3-phosphoglycérique en acide glycérique (polidase S, quarante-huit heures à  $37^\circ$ ), l'acide phosphoénolpyruvique en acide pyruvique ( $\text{SO}_4\text{H}_2\text{1N}$ , une heure à  $100^\circ$  en présence d'acide pyruvique entraîneur). Le glucose, l'acide glycérique et l'alanine radioactifs sont à nouveau chromatographiés sur papier dans le système de solvants : butanol-éthanol-eau (52,5-31-16,5). On élue ces taches et procède aux dégradations en présence d'entraîneur.

*Glucose.* — On ajoute au glucose radioactif provenant du tréhalose (5 030 coups/min.)  $100 \mu\text{M}$  de glucose entraîneur. Le mélange est fermenté dans une fiole de Warburg par *Leuconostoc mesenteroides*, selon la méthode de Gibbs et Demoss [8]. A la fin de la réaction, le  $\text{CO}_2$  est absorbé dans  $0,5 \text{ ml}$  de  $\text{NaOH2N}$ . On ajoute au contenu de la fiole,  $25 \mu\text{l}$  d'éthanol anhydre et  $36 \text{ mg}$  de lactate de zinc. L'alcool est isolé par distillation et l'acide lactique par extraction à l'éther.

Le carbonate radioactif est additionné de  $20 \text{ mg}$  de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  entraîneur et compté sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$ .

L'alcool est oxydé en acide acétique [8] ; l'acétate de sodium est ensuite dégradé par la méthode de Phares [9], sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$ .

L'acide lactique est décarboxylé selon la méthode de Friedemann [10], l'acétaldéhyde résultant est transformé en iodoforme et formiate par l'iode en milieu alcalin. L'iodoforme est compté directement et le formiate est oxydé par l'oxyde de Hg en  $\text{CO}_2$ , que l'on compte sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$ .

Les analyses donnent les résultats suivants en coups/min. :  $\text{C}_1$  : 1 230 ;  $\text{C}_2$  : 810 ;  $\text{C}_3$  : 540 ;  $\text{C}_4$  : 360 ;  $\text{C}_5$  : 740 ;  $\text{C}_6$  : 1 300.

*Acide glycérique.* — On ajoute à l'acide glycérique radioactif (1 071 coups/min.) 25,1 mg de glycérate de Ca entraîneur et le mélange est dégradé à l'acide periodique [41]. La formaldéhyde est comptée sous forme de 2-4-dinitrophénylhydrazone (après recristallisation dans benzène-alcool), le  $\text{CO}_2$  sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$  et l'acide formique sous forme de formiate de Ba (après recristallisation dans eau-alcool).

Les analyses donnent les résultats suivants en coups/min. :  $\text{C}_1$  : 242 ;  $\text{C}_2$  : 338 ;  $\text{C}_3$  : 441.

*Acide pyruvique.* — La solution contenant l'acide pyruvique radioactif (1 185 coups/min.) et 21,1 mg d'entraîneur est traitée au sulfate cérique selon la méthode de Fromageot et Desnuelles [42], légèrement modifiée. Pour 1 ml de solution, on ajoute 6 ml d'une solution saturée de sulfate cérique dans  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1/2 et 5 ml d'eau. On laisse à 37° pendant une heure et demie en faisant barboter un courant d'azote privé de  $\text{CO}_2$ . Le  $\text{CO}_2$  est récolté dans une tour de Heck contenant de la soude N décarbonatée, puis compté sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$ . L'acide acétique est entraîné à la vapeur ; l'acétate de sodium est ensuite dégradé selon la méthode de Phares [9].

Les analyses donnent les résultats suivants :  $\text{C}_1$  : 241 ;  $\text{C}_2$  : 372 ;  $\text{C}_3$  : 498 coups/min.

*Alanine.* — L'alanine radioactive (1 750 coups/min.) est additionnée de 10 mg d'entraîneur et dégradée selon la méthode de van Slyke modifiée par Benson [43]. Le  $\text{CO}_2$  est compté sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$ , l'acétaldéhyde est dégradé par l'iode en milieu alcalin comme indiqué ci-dessus.

TABLEAU III.

GLUCOSE provenant du tréhalose ‰		ACIDE 3 phosphoglycérique ‰		ACIDE phosphoenolpyruvique ‰		ALANINE ‰	
$\text{C}_1$	25	$\text{C}_3$	44	$\text{C}_3$	45	$\text{C}_3$	46
$\text{C}_2$	16	$\text{C}_2$	34	$\text{C}_2$	34	$\text{C}_2$	33
$\text{C}_3$	10	$\text{C}_1$	22	$\text{C}_1$	21	$\text{C}_1$	21
$\text{C}_4$	8						
$\text{C}_5$	15						
$\text{C}_6$	26						



Les analyses donnent les résultats suivants :  $C_1$  : 335 ;  $C_2$  : 565 ;  $C_3$  : 815 coups/min.

Le tableau III rapporte la radioactivité présente dans chaque atome de carbone, exprimée en pour cent de la radioactivité totale incorporée dans les composés.

III. ETUDES CINÉTIQUES [14]. — Pour les temps supérieurs à une minute, la technique d'incubation n'est pas modifiée et des prélèvements sont faits dans la cupule de Warburg. Pour les temps plus courts, l'incubation est faite directement dans les tubes de centrifugeuse contenant 0,2 ml de tampon.

En étudiant l'incorporation de la radioactivité en fonction du temps, on peut, d'une part, voir qualitativement un ordre d'apparition des composés formés ; d'autre part, il est possible de tirer de cette étude des renseignements concernant l'ordre réel de succession des corps d'une même famille. En effet, théoriquement, considérons deux composés A et B, B dérivant de A, et étudions en fonction du temps le rapport de la radioactivité incorporée dans chaque corps à la radioactivité totale. Le pourcentage du corps A sera très élevé au voisinage de l'origine, celui du corps B étant nul ou faible ; par la suite, le pourcentage du corps A diminuera tandis que celui du corps B augmentera jusqu'à ce que les deux corps atteignent un équilibre qui corresponde à la saturation complète. Pratiquement, la représentation graphique de cette fonction pour un ensemble de corps d'une même famille biochimique permet de déterminer l'ordre de formation. En effet, si la pente de la courbe d'un corps A est négative et celle d'un corps B positive, on peut conclure que A est précurseur de B. Des considérations semblables ont déjà servi à l'analyse cinétique de la photosynthèse [15].

Parmi les différents composés formés, nous nous sommes surtout attachés à ceux qui apparaissent les premiers et qui se rattachent directement au schéma de la glycolyse classique ou au cycle citrique : hexoses monophosphates, acide 3-phosphoglycérique, tréhalose, alanine, acide citrique, acide glutamique.

Nous avons étudié, d'une part la cinétique de l'assimilation du glucose, d'autre part celle de l'éthanol. Dans ce dernier cas les résultats sont différents selon que la levure est cultivée en présence de glucose ou d'éthanol.

A. CAS DU GLUCOSE. — Après cinq secondes d'incubation, la radioactivité est présente dans quatre taches : hexoses monophosphates, acide 3-phosphoglycérique, acide phosphoénolpyruvique et alanine. Par la suite de nombreux autres corps apparaissent et, après cinq minutes, tous les corps décrits ci-dessus sont présents. Si on calcule le pourcentage de la radioactivité incorporée dans

les différents composés par rapport à la radioactivité totale présente sur le chromatogramme en fonction du temps, on obtient les courbes représentées sur la figure 2.

B. CAS DE L'ÉTHANOL. — a) *Levure cultivée sur glucose*. — Les radioautogrammes rapportés sur la figure 4 illustrent les résultats. Après cinq secondes d'incubation, seuls les acides citrique et

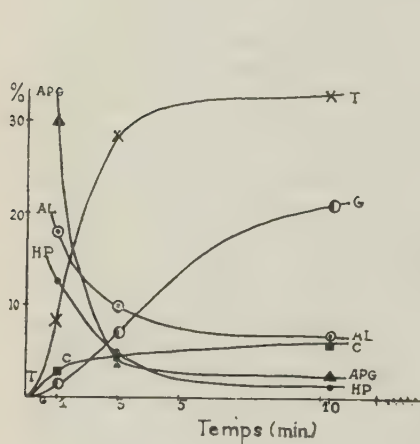


FIG. 2.

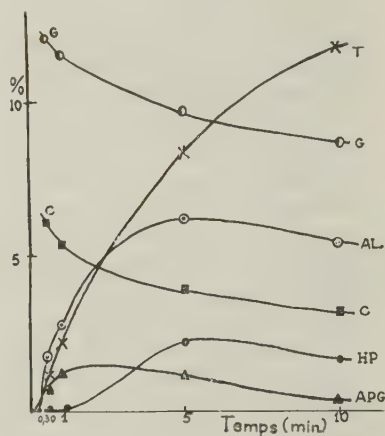


FIG. 3

FIG. 2 et FIG. 3. — Pourcentage de la radioactivité incorporée dans différents composés par rapport à la radioactivité totale présente sur le chromatogramme : HP = hexoses monophosphates, APG = acide 3-phosphoglycérique, T = tréhalose, AL = alanine, C = acide citrique, G = acide glutamique. Sur la fig. 3, les valeurs de l'acide glutamique sont divisées par 5.

glutamique sont marqués. Après une minute, on voit en plus les acides aspartique et malique, après cinq minutes l'acide lactique et la glutamine, après quinze minutes l'alanine, la valine et l'acide fumarique, après trente minutes l'asparagine. A ce moment toutefois, on ne décèle encore aucun des corps se rattachant au schéma d'Emden-Meyerhof. Ces composés n'apparaissent que sur le chromatogramme correspondant à quarante-cinq minutes d'incubation et l'intensité de leur marquage augmente par la suite (soixante minutes et quatre-vingt-dix minutes).

b) *Levure cultivée sur éthanol*. — Quand on travaille avec des cellules de levures cultivées sur eau de touraillons contenant 5 p. 100 d'éthanol, tous les composés décrits précédemment sont présents après cinq minutes d'incubation et on n'observe pas le long temps de latence précédant l'apparition des composés qui

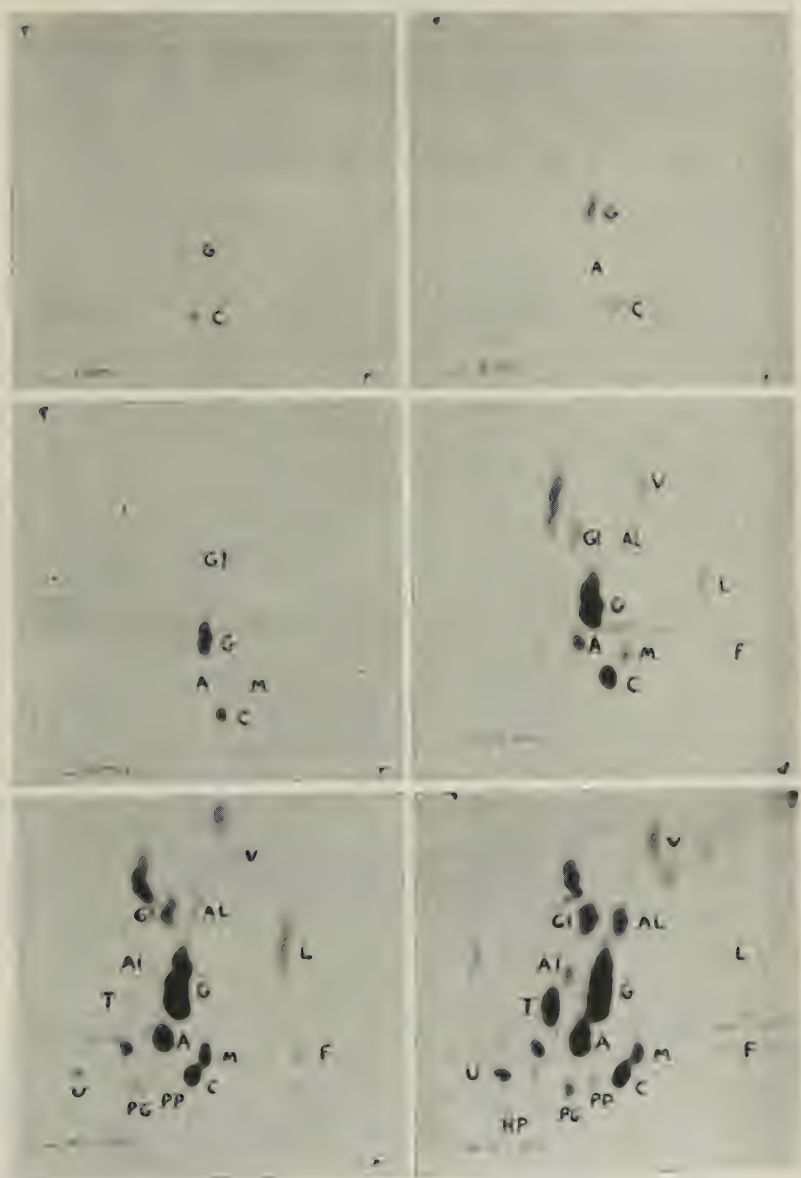


FIG. 4. — Cinétique de l'incorporation de la radioactivité à partir de l'éthanol  $^{14}\text{C}$ .  
 1 mg de levure sèche dans chaque cas. A : acide aspartique, AI : asparagine, AL : alanine, C : acide citrique, F : acide fumarique, G : acide glutamique, GI : glutamine, HP : hexoses phosphates, L : acide lactique, M : acide malique, PG : acide 3-phosphoglycérique, PP : acide phosphoénolpyruvique, T : tréhalose, U : uridinediphosphate glucose, V : valine.

se rattachent au schéma d'Emden-Meyerhof. L'analyse cinétique du métabolisme de l'éthanol par la levure cultivée sur éthanol est rapportée sur la figure 3.

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Dans l'expérience type sur glucose, la radioactivité est répartie sur une vingtaine de corps parmi lesquels on trouve de nombreux intermédiaires du cycle citrique (1) et de la glycolyse selon Emden-Meyerhof. Nous n'avons pas trouvé de produits correspondant à la dégradation oxydative du glucose, hormis le sédoheptulose phosphate, qui est ainsi identifié pour la première fois dans la levure. Enfin, une partie très importante de la radioactivité se trouve accumulée dans le tréhalose.

Si l'on compare la répartition de la radioactivité en aérobie et en anaérobie (tableau II), on voit que les corps qui se rattachent au cycle citrique, ainsi que le tréhalose sont beaucoup plus fortement marqués en aérobie qu'en anaérobie ; on observe le résultat opposé pour les corps qui se rattachent au schéma de la glycolyse classique. Un cycle citrique existe donc, même en anaérobie. D'autre part, ces résultats justifient l'explication de l'effet Pasteur donnée par Lynen [16] : en aérobie, le fonctionnement intense du cycle citrique utilise la plus grande partie du phosphate libre de la cellule ; il en résulte une diminution de l'activité de la voie glycolytique.

Dans le cas de l'éthanol, nous avons démontré que ce produit normal du catabolisme du glucose est utilisé par la levure simultanément au glucose. D'autre part, on voit que, si la radioactivité se concentre surtout dans certains corps se rattachant au cycle citrique, on observe aussi la formation jusqu'à présent supposée mais jamais démontrée d'acide phosphoenolpyruvique, d'acide phosphoglycérique et d'hexoses phosphates, qui font présumer de la réversibilité de la glycolyse.

L'emploi de l'éthanol-2- $^{14}\text{C}$  nous a permis de préciser le mécanisme de formation du tréhalose, de l'acide 3-phosphoglycérique, de l'acide phosphoenolpyruvique et de l'alanine. Le marquage relatif des différents atomes de carbone permet d'envisager le mode de formation des corps en C3 (tableau III). On connaît actuellement la possibilité d'une origine double à partir des corps en C2. Par l'intermédiaire du cycle citrique, l'acide pyruvique dérive de l'acide oxaloacétique ; d'autre part, cet acide peut se former par carboxylation d'un fragment en C2. En partant d'éthanol-2- $^{14}\text{C}$ , dans la première hypothèse la symétrie au

(1) Malgré les restrictions que Krebs doit devoir imposer à l'existence d'un cycle citrique complet dans la levure, nous avons conservé cette dénomination qui a l'avantage de définir une famille biochimique.

stade fumarique implique une identité de marquage du  $C_3$  et du  $C_2$ , le  $C_1$  atteignant au plus la moitié de la valeur de chacun des deux autres atomes de carbone. Dans la seconde hypothèse, on obtient un acide pyruvique essentiellement marqué dans le  $C_3$  et sans doute légèrement dans le  $C_1$  par suite de la faible radioactivité du  $CO_2$  réincorporé. Les résultats expérimentaux peuvent s'expliquer en supposant la coexistence des deux mécanismes, la partie de l'acide pyruvique provenant du cycle citrique étant du type  $C^{++} - C^{++} - C^+$ , et l'autre provenant de la carboxylation étant du type  $C^{++} - C - C^+$ . Le mode de marquage de l'alanine qui dérive directement de l'acide pyruvique s'explique de la même manière. D'autre part, la similitude du marquage des atomes  $C_1$  et  $C_6$ ,  $C_2$  et  $C_5$ ,  $C_3$  et  $C_4$  du glucose provenant du tréhalose indique une synthèse par condensation de fragments identiques en  $C_3$ . Enfin, le mode de marquage du tréhalose et des acides phosphoenolpyruvique et 3-phosphoglycérique établit une parenté certaine entre ces corps. L'ordre de filiation est déterminé par les mesures cinétiques.

L'étude cinétique de l'incorporation du glucose (fig. 2) est en accord avec les faits déjà connus : les hexoses-phosphates et l'acide 3-phosphoglycérique précèdent l'apparition des acides citrique et glutamique. L'alanine, qui dérive de l'acide pyruvique, se comporte comme l'acide phosphoglycérique. Remarquons d'autre part que, si on prolonge l'expérience jusqu'à une heure, le pourcentage des corps étudiés passe par un maximum, sauf celui du tréhalose qui atteint 50 p. 100 ; ce composé s'accumule donc à l'intérieur de la cellule.

Dans le cas de l'éthanol, les courbes de la figure 3 établissent la réversibilité de la glycolyse : les hexoses phosphates et le tréhalose apparaissent après l'acide 3-phosphoglycérique. L'alanine se comporte comme l'acide 3-phosphoglycérique et le tréhalose s'accumule.

#### RÉSUMÉ.

1° Nous avons étudié la nature des différents corps où la radioactivité est incorporée au cours de la dégradation du glucose par la levure de boulangerie vivante et précisé l'influence des conditions d'aération.

2° Nous avons identifié les principaux intermédiaires formés au cours du métabolisme de l'éthanol et mis en évidence l'assimilation simultanée du glucose et de l'éthanol.

3° L'analyse de la répartition de la radioactivité dans les différents atomes de carbone du tréhalose, de l'acide 3-phosphoglycérique, de l'acide phosphopyruvique et de l'alanine synthétisés à partir de l'éthanol-2- $^{14}C$  nous a permis de déduire le mode de formation de ces produits.



4° Par des études cinétiques nous avons mis en évidence les premiers intermédiaires formés et analysé leur ordre de succession, démontrant la réversibilité de la glycolyse à partir de l'éthanol.

#### SUMMARY.

1° The authors have studied the nature of different compounds in the course of the degradation of glucose by living baker's yeast and established the influence of aeration conditions.

2° They identified the principal substances formed in the course of the metabolism of ethanol and demonstrated the simultaneous assimilation of glucose and ethanol.

3° Studying the radioactivity of different carbon atoms of trehalose, 3-phosphoglyceric acid, phosphopyruvic acid and alanine synthesized from 2-C<sup>14</sup>-ethanol, the authors have been able to follow the formation of these substances.

4° A kinetic study of the phenomenon has allowed the identification of the first intermediate substances and to demonstrate the chronology of their appearance. In this way, they succeeded in demonstrating the reversibility of glycolysis from ethanol.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-P. AUBERT et G. MILHAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 1943.
- [2] A. A. BENSON, J. A. BASSHAM, M. CALVIN, T. C. GOODALE, V. A. HASS et N. STEPKA. *J. Amer. chem. Soc.*, 1950, **72**, 1710.
- [3] R. BOISSONNAS. *Helv. Chim. Acta*, 1950, **33**, 1966.
- [4] J. G. BUCHANAN, V. H. LYNCH, A. A. BENSON, D. F. BRADLEY et M. CALVIN. *J. biol. Chem.*, 1953, **203**, 935.
- [5] G. MILHAUD et J.-P. AUBERT. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2178.
- [6] M. LEMOIGNE, J.-P. AUBERT et J. MILLET. *Ces Annales*, 1954, **87**, 427.
- [7] J.-P. AUBERT et G. MILHAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2451.
- [8] M. GIBBS et R. D. DEMOSS. *J. biol. Chem.*, 1954, **207**, 689.
- [9] E. F. PHARES. *Arch. Biochem. Bioph.*, 1951, **33**, 173.
- [10] T. E. FRIEDEMANN et A. I. KENDALL. *J. biol. Chem.*, 1929, **82**, 23.
- [11] J. A. BASSHAM, A. A. BENSON et M. CALVIN. *J. biol. Chem.*, 1950, **185**, 781.
- [12] C. FROMAGEOT et P. DESNUELLES. *Biochem. Z.*, 1935, **279**, 174.
- [13] In M. CALVIN et coll. *Isotopic Carbon*. J. Wiley édit., New-York, 1949, p. 26.
- [14] G. MILHAUD et J.-P. AUBERT. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **241**, 525.
- [15] A. A. BENSON, S. KAWAUCHI, P. HAYES et M. CALVIN. *J. Amer. chem. Soc.*, 1952, **74**, 4477.
- [16] F. LYNEN et R. KOENIGSBERGER. *Liebig's Ann.*, 1951, **573**, 60.

# INDIVIDUALISATION DE 10 ANTIGÈNES ÉRYTHROCYTAIRES CHEZ LES CHÈVRES AU MOYEN D'ISO-IMMUNSÉRUMS DE MOUTON

par P. MILLOT et A. EYQUEM.

(Institut Pasteur,  
Centre d'Etudes des Groupes sanguins des Animaux.  
Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins,  
[Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

Nous avons antérieurement signalé qu'il est possible de mettre en évidence différents antigènes érythrocytaires chez la chèvre à l'aide de trois systèmes de sérums : hétéro-immunsérums de lapin anti-chèvre, iso-immunsérums de chèvre, iso-immunsérums de mouton. Ces derniers sérums révèlent, de plus, l'existence de communauté antigénique entre la chèvre et le mouton.

Nous avons étudié l'action, sur les globules rouges de 27 chèvres, des iso-immunsérums ovins de référence, utilisés pour la détermination chez les moutons des antigènes A, B, C, E, G, D, H, I, J, K. Les 5 premiers immunsérums possèdent un anticorps agglutinant, tandis que les 5 derniers sont hémolytiques en présence de complément de cobaye [2]. Des absorptions ont été réalisées à l'aide de culots globulaires de chèvre.

Le sérum ovin anti-A agglutinait certaines suspensions globulaires de chèvre ; 14 échantillons de ce sérum ont été respectivement mis en contact avec 14 culots globulaires de chèvre, et 2 échantillons du même sérum ont été mis en contact avec 2 culots globulaires de mouton, dont un possédait l'antigène A. Comme cela avait été observé précédemment [1], le sérum s'est révélé contenir un anticorps anti-chèvre spécifique, absorbable par certains culots globulaires caprins. Cet anticorps était distinct de l'anti-A ovin, qui était absorbable uniquement par le culot globulaire ovin porteur de l'antigène A.

Le sérum ovin anti-B n'agglutinait aucune des 24 suspensions globulaires de chèvre examinées ; corrélativement, le pouvoir agglutinant de ce sérum pour les globules rouges ovins du

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 3 novembre 1955.

groupe B ne parut pas modifié par contact avec des culots globulaires provenant de 10 chèvres.

De même, l'anticorps du sérum anti-C n'agglutinait aucune des 23 suspensions globulaires de chèvre examinées et n'était absorbable par aucun des culots globulaires correspondants. Au contraire, le sérum anti-E agglutinait les 24 suspensions de globules rouges de chèvre, et des échantillons du sérum, absorbés à l'aide de 10 culots globulaires caprins pris au hasard, se montrèrent incapables d'agglutiner les suspensions globulaires de chèvre ou les suspensions globulaires de mouton du groupe E, ce qui prouve l'existence, chez toutes les chèvres examinées, de l'antigène ovine E.

Le sérum anti-G agglutinait fortement une des 27 suspensions globulaires de chèvre.

Dans les mêmes conditions, les trois sérums ovins anti-D, H, I, n'hémolysaient aucune suspension globulaire de chèvre, tandis que le sérum anti-J hémolysait les 27 suspensions. L'absorption de ce dernier sérum par 10 culots globulaires caprins fit disparaître l'anticorps anti-J actif sur la suspension globulaire ovine de ce groupe, choisie comme témoin positif, tandis que les suspensions caprines n'étaient plus hémolysées par les fractions absorbées. Comme l'antigène E, l'antigène J était donc présent chez toutes les chèvres examinées.

Comme nous l'avons signalé [4], le sérum anti-K déce le l'antigène correspondant chez certaines chèvres dont les culots globulaires sont capables d'absorber l'agglutinine anti-K. L'antigène K se rencontre donc chez les chèvres comme chez les moutons. Ajoutons que, parmi 20 chèvres examinées de provenance variée, 6 seulement possédaient l'antigène K, tandis que 9 individus de race Shannon, examinés récemment, se révélaient tous K-positifs.

Au total, aucune des chèvres examinées ne possédait les antigènes ovins A, B, C, D, H, I, une possédait très vraisemblablement l'antigène G, 15 possédaient l'antigène K, et les 27 chèvres possédaient les antigènes E et J.

Ces résultats n'ont aucun rapport apparent avec la fréquence observée chez les moutons pour ces différents antigènes.

Les sérums ovins de référence anti-A, B, C, etc. dont il a été question, avaient été absorbés, au cours de leur préparation, à l'aide de culots globulaires de moutons choisis, et éventuellement dilués après absorption.

Treize iso-immunsérums ovins n'ayant, au contraire, subi aucune préparation, ont été absorbés à l'aide de culots globulaires de chèvre. Treize chèvres parmi les 27 précédemment étudiées ont fourni des culots globulaires permettant de préparer pour chaque sérum, 13 fractions absorbées. L'activité de ces

fractions a été étudiée sur le sang des 27 animaux par la réaction d'hémolyse, en présence de complément de cobaye frais dilué au 1/10 (pour les techniques utilisées, pour l'origine et la dénomination des immunsérums, nous renvoyons le lecteur à notre article : « Les groupes sanguins des moutons » [2]).

Les fractions absorbées de 2 de ces sérums ont été étudiées également par la technique d'agglutination, le pouvoir agglutinant des 11 autres sérums s'étant révélé nul ou négligeable.

Le sérum P 16 contenait l'hémolysine anti-J qui hémolysait toutes les suspensions globulaires de chèvre et que l'on aurait pu considérer comme un anticorps hétéro-spécifique. Il contenait, en outre, un anticorps hémolysant 10 suspensions globulaires de chèvre sur 25. Nous avons nommé anti-L cet anticorps hémolytique, après avoir vérifié qu'il ne correspondait à aucun anticorps déjà connu. L'hémolysine anti-L a été rencontrée, accompagnée d'une fraction hémolytique indéterminée, dans le sérum B 15, et associée à divers anticorps dans les sérums suivants : R 535, S 233, B 31, R 456 et S 6. Dans ce dernier sérum, elle était associée à l'hémolysine anti-K. Il est intéressant de remarquer à ce sujet que l'anticorps anti-K avait été rencontré dans le sérum S 6, sous forme agglutinante pour les globules rouges de mouton. Au contraire, pour les globules rouges de chèvre, il se comportait uniquement comme une hémolysine. Le sérum S 6 contenait encore un troisième anticorps hémolytique, actif sur une suspension caprine et absorbable seulement par le culot correspondant. Nous avons nommé N l'antigène correspondant à cette hémolysine qui est rencontrée seule dans les sérums IP 5, S 1, S 2. De son côté, l'hémolysine anti-K est retrouvée seule dans le sérum IP 12. Notons encore que l'anti-N est absorbable par les 2 culots ovins utilisés comme témoins. L'antigène existerait donc chez certains moutons.

Le sérum R 535 s'est révélé contenir en plus de l'hémolysine anti-L, une hémolysine active sur 15 des 24 suspensions examinées ; nous avons nommé anti-M cette hémolysine.

Les sérums S 233 et S 235, dont la réaction est presque identique, contiennent, outre les 2 hémolysines anti-K et anti-L, une hémolysine active sur 10 suspensions globulaires de chèvre sur 26 : nous avons nommé anti-Q cette hémolysine qui se trouve être seule présente dans un autre sérum L 2, mais à un titre faible. Dans ce dernier sérum, seule l'absorption permet de la reconnaître, étant donné le phénomène décrit ailleurs des affinités variables [2].

Enfin les sérums B 31 et R 456 ont été étudiés par absorption sur 20 culots globulaires et réaction des fractions absorbées sur les 20 suspensions correspondantes. Dans ces deux sérums, on met facilement en évidence, d'une part l'hémolysine anti-L, d'autre

part une nouvelle hémolysine active sur 8 des 20 suspensions, que nous avons nommée l'anti-P.

Les agglutinations effectuées avec les fractions absorbées du sérum IP 5 ont mis en évidence une agglutinine correspondant à l'hémolysine anti-N du même sérum. Des épreuves analogues effectuées à partir du sérum IP 12 ont permis de découvrir un autre anticorps agglutinant que nous avons nommé anti-O. La répartition de l'antigène O est encore mal définie, mais nous avons constaté que l'agglutinine anti-O n'était autre que celle dont il a été question au début de cette étude, à savoir : l'agglutinine anti-chèvre spécifique du sérum anti-A ovin, ceci bien que le mouton IP 12 ne soit pas le donneur de ce sérum étalon. Il est possible que cette agglutinine soit rencontrée assez fréquemment chez les moutons.

Au total, ces 7 hétéro-anticorps ovins anti-caprins iso-spécifiques ont été élaborés par 13 moutons suivant le tableau I : le numéro des animaux étant porté en abscisse, et la désignation des antigènes en ordonnée, la production d'anticorps est figurée par une croix.

TABLEAU I.

antigènes	ANIMAUX	ANIMAUX												
		S 935	S 935	S 935	R 535	R 535	R 456	IP 10	P 16	P 15	L 9	P 5	S 1	S 2
K		+	+	+			+							
L		+	+	+	+	+		+	+					
M					+									
N				+							+	+	+	
O							+							
P					+	+								
Q		+	+							+				

On voit sur ce tableau que l'anticorps anti-L est produit par 8 moutons, que les anticorps anti-K et anti-N sont produits par 4, que l'anti-Q est produit par 3, que l'anti-P est produit par 2, que l'anti-M et l'anti-O sont produits par un seul mouton ; 3 moutons ont élaboré 3 anticorps, 4 en ont élaboré 2, 6 en ont élaboré un. Nous passons sous silence quelques fractions hémolytiques de faible titre restées indéterminées.

Le tableau II donne la répartition des antigènes sur les globules rouges des 27 chèvres dans l'état actuel de nos connaissances. Les cases blanches marquent les réactions incertaines en raison du faible titre des anticorps (agglutinine anti-O), ou les absences de détermination pouvant résulter de la disparition de certains animaux. On voit que les combinaisons antigéniques sont variées et que l'on s'achemine vers l'individualisation prochaine des différentes chèvres.



TABLEAU II.

TAB. 2																										
- RÉPARTITION DES ANTIGÈNES GLOBULAIRES CHEZ 27 CHÈVRES -																										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
K	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	K	K	-	K	K	K	K	K	K	K	K
-	-	-	L	L	-	L	-	-	-	-	-	-	L	-	-	L	L	-	L	-	-	-	L	-	-	L
-	-	-	M	-	-	M	M	M	-	M	-	-	-	M	M	M	M	-	M	M	M	-	-	-	-	M
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-
0	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	P	-	-	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-	P	-	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-
Q	-	Q	-	Q	-	-	Q	-	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	Q	Q	Q	-	-	Q	-	0

La présence dans le sérum de moutons iso-immunisés d'anticorps spécifiques anti-chèvre est certaine. Cependant, exception faite d'anti-K, aucun de ces anticorps ne nous a paru assimilable aux iso-anticorps de mouton précédemment découverts dans les mêmes sérums.

# RÉSUMÉ.

Il est possible d'individualiser, chez la chèvre, 10 antigènes érythrocytaires différents. Quatre de ces antigènes existent aussi chez le mouton. Les antigènes E et J, repérables l'un par agglutination, l'autre par hémolyse, se trouvent chez toutes les chèvres examinées. L'antigène G, révélable par agglutination, ne se retrouve que chez une des 27 chèvres examinées. L'antigène K peut être identifié par hémolyse chez 16 des 27 chèvres.

Les chèvres ne possèdent pas les antigènes érythrocytaires A, B, C, D, H, I individualisés chez les moutons. Certaines d'entre elles possèdent les antigènes L, M, Q et P identifiables par hémolyse, l'antigène O révélable par agglutination, ou l'antigène N décelé par agglutination et par hémolyse.

# SUMMARY.

Ten erythrocytic antigens may be distinguished in goats. Four of them also exist in sheep. All the samples of goats erythrocytes examined by the authors contain E and J antigens, the one being identified by agglutination, the other by hemolysis. The G antigen, which may be identified by agglutination, was only present in

one of 27 goats. The K antigen, identified by hemolysis, was found in 16 of 27 goats.

The A, B, C, D, H and I antigens, present in sheep, are absent in goats. Certain goats also possess the M, Q and P antigens, as demonstrated by hemolysis, and O antigen, revealed by agglutination, or the N antigen, identified by agglutination and hemolysis.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. EYQUEM et P. MILLOT. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1224.
- [2] P. MILLOT et A. EYQUEM. *Rev. Path. gén. comp.*, 1955, n° 672 et 673 ; 1956, n° 674.

## ÉTUDE SUR LE MÉTABOLISME DU *p*-AMINOPHÉNYLSULFAMIDE *IN VIVO*

par FERNAND BOYER, MICHELINE SAVIARD et MONIQUE DECHAVASSINE (\*).

(*Institut Pasteur*)

Dans une note préliminaire [1] nous avons signalé la présence, dans l'urine de l'homme et des animaux (souris, rats, lapins, chiens) traités avec du *p*-aminophénylsulfamide (1162 F), du produit administré et de deux substances diazotables.

Ces substances, étudiées au moyen de la chromatographie de partage sur papier et de différents tests chimiques et bactériologiques, ne possèdent pas les propriétés du sulfamide N-acétylé retrouvé par Marshall et ses collaborateurs [2] dans l'urine de l'homme et des animaux traités avec du sulfamide.

Nous avons été amenés à comparer les substances retrouvées dans l'urine, après traitement sulfamidé, à des produits de synthèse connus dérivés du *p*-aminophénylsulfamide.

### EXPÉRIENCES.

Nous avons soumis à la chromatographie de partage sur papier l'urine de douze heures d'un homme ayant absorbé par la bouche 3 g de *p*-aminophénylsulfamide en trois heures, et celle de souris, de rats, de lapins, de chiens, ayant ingéré 1 g par kilo du même sulfamide ; les urines des animaux ont été recueillies pendant les vingt-quatre heures qui ont suivi l'administration du produit.

### TECHNIQUES.

CHROMATOGRAPHIE UNI-DIMENSIONNELLE DE L'URINE SUR PAPIER. — L'urine à analyser est déposée sur des bandes de papier Arches 302. Le cheminement descendant se fait dans trois systèmes de solvants différents :

N-butanol-ammoniaque-eau .....	12, 3, 15
N-butanol-acide acétique-eau .....	12, 1, 12
N-butanol-éthanol-eau .....	4, 1, 1

(\*) Manuscrit reçu le 9 novembre 1955.

La position des substances sur le chromatogramme est révélée des deux façons suivantes :

1° Par vaporisation de réactif d'Ehrlich (1) ;

2° Après hydrolyse acide sur papier, par diazotation et copulation avec le chlorhydrate de naphthyl-diéthylpropylène-diamine (réactif IV de Tréfouël) en utilisant la technique suivante :

La bande de papier retirée du solvant est séchée. Elle est imprégnée par vaporisation d'acide chlorhydrique dilué au tiers, et maintenue pendant quinze à trente minutes dans la vapeur d'eau au-dessus d'un bain-marie bouillant. Après séchage, on vaporise, successivement, du nitrite de sodium en solution à 0,1 p. 100, du sulfamate d'ammonium à 0,5 p. 100, puis du réactif IV à 0,1 p. 100. On laisse sécher le papier après chaque vaporisation (2).

#### RÉSULTATS.

Après vaporisation de réactif d'Ehrlich sur le chromatogramme, quatre taches de couleur jaune ou orange apparaissent, quels que soient l'urine déposée (souris, rat, lapin, chien ou homme) et le solvant utilisé. Après cheminement dans le N-butanol ammoniacal, l'une de ces taches, peu marquée, de couleur jaune, a une valeur de Rf de 0,08 ; l'autre, de couleur orange, plus marquée, a un Rf de 0,15 ; ces deux taches représentent des substances résultant du métabolisme du *p*-aminophénylesulfamide dans l'organisme puisqu'elles n'existent pas sur les chromatogrammes réalisés, dans les mêmes conditions, avec des solutions aqueuses de sulfamide ou avec de l'urine d'animaux non traités.

Une troisième tache, jaune clair, de Rf 0,40, représente l'urée et est retrouvée sur tous les chromatogrammes de l'urine d'animaux témoins.

La quatrième, la plus importante du point de vue quantitatif, de Rf 0,57, de couleur orange, a la même position que celle obtenue avec des solutions de *p*-aminophénylesulfamide, après cheminement dans les trois solvants différents.

Après hydrolyse, diazotation et copulation, sur le papier, suivant la technique décrite plus haut, les substances sont indiquées par des taches roses ou rouges suivant la quantité de produit contenue dans l'urine.

Sur les chromatogrammes effectués avec l'urine de l'homme et celle de souris, nous découvrons quatre taches dont trois de Rf 0,08, 0,15 et 0,57 sont déjà apparues après révélation au réactif d'Ehrlich, et une nouvelle tache de Rf 0,73.

(1) Solution alcoolique de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde à 1 g/litre.

(2) Nitrite de sodium : 100 mg dans 2 ml d'eau ; alcool à 96° : q. s. 100 ml. Sulfamate : 500 mg dans 5 ml d'eau ; alcool à 96° : q. s. 100 ml. Réactif IV : 100 mg dans 100 ml ; alcool à 96°.

L'urine du chien nous montre trois substances de Rf 0,08, 0,15 et 0,57 comme après révélation avec le réactif d'Ehrlich sans hydrolyse préalable.

L'urine de lapins et de rats donne naissance à cinq taches de Rf 0,08, 0,15, 0,35, 0,57, 0,73.

La tache représentant l'urée (Rf 0,4) n'apparaît pas par cette méthode.

Ces mêmes urines chauffées pendant une heure à 100°, avec de l'acide chlorhydrique N/2, avant d'être déposées sur la bande de papier, donnent une seule tache de Rf 0,57.

Les produits de métabolisme contenus dans ces urines ont été décomposés par hydrolyse et ont permis la reconstitution du sulfamide.

Nous nous trouvons donc en présence de plusieurs substances formées dans l'organisme animal à partir du *p*-aminophénylsulfamide. Certaines d'entre elles possèdent dans leur noyau une fonction amine libre puisqu'elles se colorent facilement sous l'action du réactif d'Ehrlich, tandis que les autres ne sont révélées qu'après hydrolyse acide.

#### ESSAI D'IDENTIFICATION DE CES SUBSTANCES.

Dans les expériences qui suivent nous avons comparé les chromatogrammes de l'urine de rats traités avec du *p*-aminophénylsulfamide : d'une part, avec des solutions de produits de synthèse connus, dérivés du *p*-aminophénylsulfamide ; d'autre part enfin, avec de l'urine de rats traités avec ces produits.

Nos essais ont porté sur les produits suivants :

a) Acide sulfinique, acide *p*-aminosulfonique et acide *p*-acétylaminosulfonique.

Ces trois produits donnent des taches de Rf 0,08 à 0,1 mais ils ne sont pas hydrolysables, alors que la substance Rf 0,08 trouvée dans l'urine des animaux traités avec du sulfamide n'apparaît plus sur les chromatogrammes faits avec de l'urine chauffée en présence d'acide chlorhydrique.

b) Les dérivés acétylés du *p*-aminophénylsulfamide : *p*-acétylaminophénylsulfamide, *p*-aminophénylsulfonacétamide, et *p*-acétylaminophénylsulfonacétamide, ont davantage retenu notre attention. En solution alcoolique, chacun d'eux donne sur le chromatogramme, après hydrolyse, diazotation et copulation, une tache dont la couleur et la valeur de Rf sont identiques à celles de l'une des taches figurant sur les chromatogrammes de l'urine de rats traités avec le *p*-aminophénylsulfamide.

De plus, l'urine de rats ayant ingéré ces produits contient les mêmes substances, en quantités différentes suivant le corps administré.



Parmi les produits que nous avons essayés, aucun n'a montré les mêmes propriétés que la substance de Rf 0,08 figurant sur les chromatogrammes d'urine après traitement sulfamidé. La figure 1 représente l'un des chromatogrammes réalisé avec de

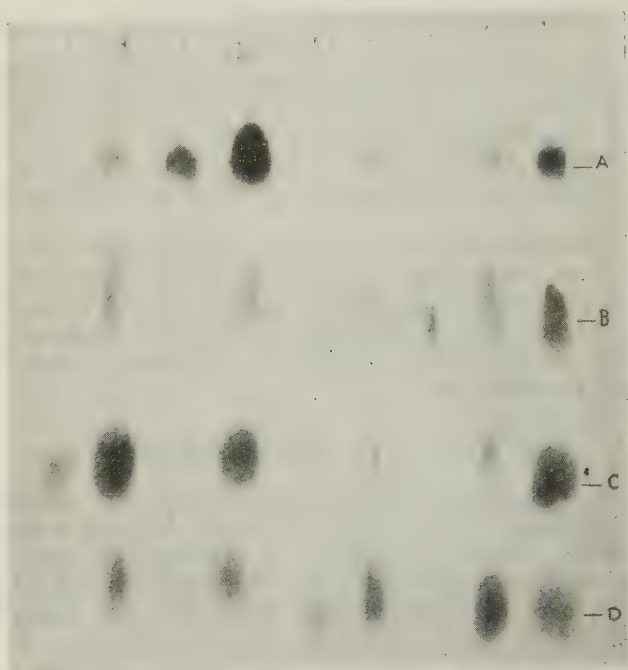


FIG. 1. — *p*-aminophénylesulfamide en solution aqueuse ; tache position C (Rf 0,57). — 2. Urine de rats traités avec du *p*-aminophénylesulfamide ; 4 taches, A, B, C, D. (Rf 0,15, 0,35, 0,57, 0,73). — 3. *p*-aminophénylesulfonacétamide en solution aqueuse ; tache A (Rf 0,15). — 4. Urine de rats traités avec le *p*-aminophénylesulfonacétamide ; 4 taches, A, B, C, D. — 5. *p*-acétylamino-phénylesulfamide en solution aqueuse ; tache D (Rf 0,73). — 6. Urine de rats traités avec du *p*-acétylamino-phénylesulfamide ; 4 taches, A, B, C, D. — 7. *p*-acétylamino-phénylesulfonacétamide en solution aqueuse. — 8. Urine de rats traités avec le *p*-acétylamino-phénylesulfonacétamide ; 4 taches, A, B, C, D. — 9. Mélange *p*-aminophénylesulfamide, *p*-aminophénylesulfonacétamide, *p*-acétylamino-phénylesulfamide, *p*-acétylamino-phénylesulfonacétamide ; 4 taches, A, B, C, D. (Rf 0,15, 0,35, 0,57, 0,73).

l'urine de rats traités avec ces divers produits en comparaison avec leurs solutions dans l'alcool absolu.

Ces résultats montrent que les substances de métabolisme du

(3) Cette substance a été isolée et identifiée comme étant le *p*-aminophénylesulfonacétamide [3] et est très connue sous le nom d'Albucid.

*p*-aminophénylsulfamide que nous retrouvons dans l'urine des animaux traités sont probablement des produits d'acétylation de ce corps. D'autre part, après ingestion par le rat de l'un de ces produits, les trois autres sont retrouvés en quantités inégales dans l'urine des rats.

Il y a donc acétylation et désacétylation de ces corps dans l'organisme.

#### DOSAGE QUANTITATIF DES SUBSTANCES PRÉSENTES SUR LES CHROMATOGRAMMES.

Nous avons employé la méthode utilisée par R. Jones et J. Wignall [4].

L'urine à doser (0,25 ml) est déposée en trait sur la bande de papier, sur une longueur de 11 cm ; 1 goutte de cette même urine est placée à 3 cm de chaque extrémité du trait.

Après cheminement dans le N-butanol ammoniacal (seize heures environ), on découpe de chaque côté du chromatogramme les bandes de papier où ont été déposées les gouttes témoins, on les révèle par hydrolyse et diazotation. La position des substances étant ainsi indiquée, des bandes sont découpées suivant la largeur donnée par la dimension des taches témoins. Plusieurs portions sont ainsi obtenues et introduites chacune dans un tube à essai contenant 20 ml de ClHN. Après chauffage au bain-marie pendant une heure à 100°, les produits contenus dans chaque portion de papier sont dosés par la méthode de Marshall [5].

#### RÉSULTATS.

Les résultats exprimés en *p*-aminophénylsulfamide sont rassemblés dans le tableau I.

TABLEAU I. — Pourcentage de chaque substance  
retrouvé dans l'urine après traitement sulfamidé.

VALEUR DE R <sub>f</sub>	HOMME	CHIEN	LAPIN	RAT	SOUSIS
0,15 . . . . .	5	15	1	5	3,5
0,35 . . . . .	0	0	8 à 10	1,5 à 2	0
0,57 . . . . .	60	85	35 à 40	80	71
0,73 . . . . .	35 à 40	0	40	40	25

D'après ces résultats, le sulfamide est éliminé dans l'urine sous forme libre et sous forme conjuguée en quantités très variables. L'homme et le lapin en transforment environ 50 p. 100 alors que

le chien, le rat et la souris éliminent la plus grande partie sous forme inchangée.

Les produits de conjugaison retrouvés dans l'urine sont différents suivant l'espèce envisagée.

#### RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE.

TECHNIQUES. — *Bacillus subtilis* est très sensible à l'action des sulfamides ; de plus, il se cultive facilement dans un milieu synthétique exempt d'anti-sulfamides. C'est pourquoi nous avons choisi ce germe pour tester l'activité antibactérienne des diverses substances figurant sur les chromatogrammes d'urine.

Dans une cuve plate de 30 x 25 cm, on coule 120 ml de milieu synthétique gélosé à 2 p. 100. Après refroidissement on coule à nouveau 60 ml du même milieu ensemencé avec des spores de *Bacillus subtilis*. Cette gélose liquide est soigneusement étalée sur toute la surface de la cuve ; celle-ci est alors recouverte avec une plaque de verre et mise à une température de +2°, +4° pour solidification.

L'urine de rats traités avec du sulfamide a été déposée en trait sur le papier et les substances ont été séparées par un cheminement de huit heures dans le N-butanol ammoniacal. Après séchage à 37° une bande de papier de 1 cm de large, découpée dans le sens de la longueur, est déposée sur la surface de la gélose préparée à l'avance. La cuve est mise à 37° et les résultats sont lus après un séjour de vingt-quatre heures à cette température. Le reste du chromatogramme, après hydrolyse acide sur papier, servira de témoin pour déterminer la position des substances étudiées.

#### RÉSULTATS.

Parmi toutes les substances retrouvées sur les chromatogrammes, deux seulement montrent une activité antibactérienne marquée. Elles sont situées, l'une au niveau du *p*-aminophénylsulfonacétamide et l'autre au niveau du *p*-aminophénylsulfamide.

Sur le chromatogramme la bande A représente un témoin *p*-aminophénylsulfamide en solution aqueuse ; la bande B, l'urine d'un rat traité avec du sulfamide, et la bande C, un témoin *p*-aminophénylsulfonacétamide en solution aqueuse (fig. 2).

D'autre part, des essais effectués vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Proteus vulgaris* X19, par la méthode des dilutions, nous ont donné les résultats suivants :

Les sulfamides N-4 et N-1 N-4 acétylés sont inactifs, à saturation. Par contre, le dérivé N-1 acétylé est environ deux fois plus actif que le *p*-aminophénylsulfamide.

« IN VIVO ». — Dans la streptococcie expérimentale de la

souris, les dérivés N-1 et N-4 acétylés sont très inférieurs au *p*-aminophénylsulfamide. Le dérivé N-1 N-4 acétylé n'assure aucune protection.

Ces résultats laissent supposer que le *p*-aminophénylsulfo-

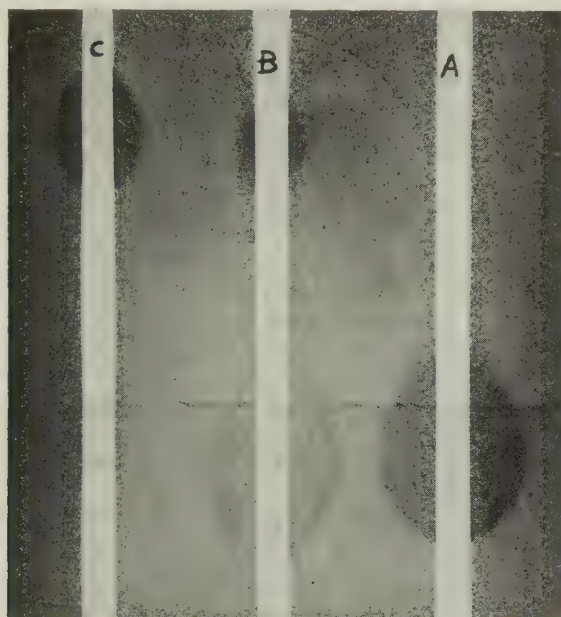


FIG. 2.

acétamide est en partie acétylé sur l'amine dans l'organisme et perd, de ce fait, une grande partie de son activité.

#### RÉSUMÉ.

Le *p*-aminophénylsulfamide est transformé dans l'organisme en plusieurs substances de métabolisme éliminées dans l'urine des animaux traités.

La chromatographie de partage sur papier a permis de comparer à ces substances de métabolisme, trois produits de synthèse dérivés du *p*-aminophénylsulfamide, le N-1, N-4 et N-1 N-4 acétylés, donnant sur les chromatogrammes les mêmes *R<sub>f</sub>* respectifs. L'une de ces substances a été isolée et identifiée au sulfamide N-1 acétylé [3].

D'autre part, l'urine de rats traités avec les sulfamides N-1,

N-4 et N-1-N-4 acétylés contient, en quantités variables, les mêmes substances que celles des animaux traités avec le *p*-aminophénylsulfamide.

L'acétylation sur l'amine par l'organisme d'une partie importante du sulfamide administré, diminue considérablement son action thérapeutique, ces produits N-4 acétylés n'ayant qu'une faible activité antibactérienne *in vivo*.

#### SUMMARY.

*p*-aminophenylsulphamide is transformed in the organism into several metabolic substances which are eliminated in the urine of the treated animals.

Separation by paper chromatography has allowed the comparison of these metabolic substances, three synthesized products derived from *p*-aminophenylsulphamide acetylated N-1, N-4 and N-1-N-4, giving on the chromatograms the same Rf respectively. One of these substances has been isolated and identified as acetylated N-1 sulphamide.

On the other hand, the urine of rats treated with acetylated N-1, N-4 and N-1-N-4 sulphamides, contains in varying quantities, the same substances as in animals treated with *p*-aminophenylsulphamide.

The acetylation by the organism of a large part of the sulphamide, reduces considerably its therapeutic action, the acetylated N-4 products having only a slight antibacterial activity *in vivo*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. BOYER, M. SAVIARD et M. DECHAVASSINE. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2023.
- [2] E. K. MARSHALL JR., W. C. CUTTING et K. EMERSON. *Science*, 1937, **85**, 202.
- [3] G. MILHAUD, J.-P. AUBERT et F. BOYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 2090.
- [4] D. R. JONES et S. WIGNAL. *Nature*, , **175**, 207.
- [5] E. K. MARSHALL JR. *J. biol. Chem.*, 1937, **122**, 263.



# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.)

Séance du 5 Janvier 1956.

Présidence de M. PRÉVOT.

---

## PRÉSENTATION D'OUVRAGE

**M. Gastinel** : J'ai l'honneur de présenter à la Société Française de Microbiologie cet ouvrage intitulé : *Eléments d'immunologie générale*, que j'ai écrit en collaboration avec Fasquelle et Barbier, et que vient d'éditer la maison Masson (1).

Dans un nombre de pages obligatoirement limité, nous avons cependant essayé d'envisager les divers problèmes posés par l'étude d'un sujet aussi vaste : les protéines plasmatiques et le complément, les antigènes de types variés et leurs anticorps correspondants, l'antigénicité, les modalités de la réaction antigène-anticorps, les processus cellulaires et les phénomènes de refus avec leur apparentement endocrinien et neuro-végétatif, les phénomènes de sensibilisation, anaphylactique ou allergique, enfin les différents aspects de l'immunité.

Nous espérons que ce livre, accompagné d'une abondante bibliographie, pourra aider les travailleurs et être lu avec quelque profit par ceux qui veulent compléter leur formation biologique.

(1) P. GASTINEL, R. FASQUELLE et P. BARBIER. *Eléments d'immunologie générale*, 1 vol. 335 p., Masson édit., Paris 1955.

## COMMUNICATIONS

**SUR L'APTITUDE DU VIRUS DE KIKUTH  
A DÉTERMINER  
LA FORMATION D'INCLUSIONS CYTOPLASMIQUES**

par H. JACOTOT, J. C. LEVADITI et A. VALLÉE.

*(Institut Pasteur, Services de Microbiologie Animale  
et d'Anatomie Pathologique.)*

Nous avons rapporté récemment, ici même, l'observation d'un foyer de variole du canari dans le département de Seine-et-Marne [4].

Depuis que Kikuth et Gollub ont isolé et caractérisé le virus qui détermine cette maladie, elle a fait l'objet de plusieurs études expérimentales, dont la lecture fait ressortir des discordances portant sur deux points que nous envisagerons brièvement.

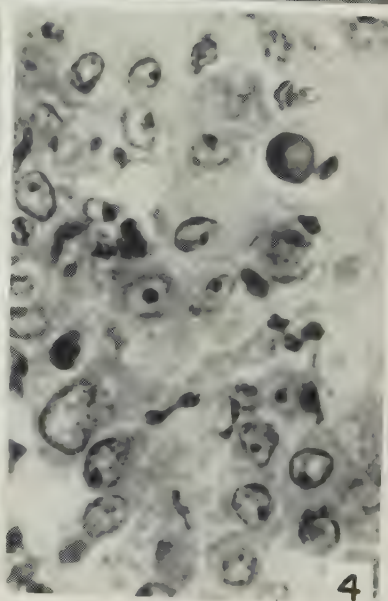
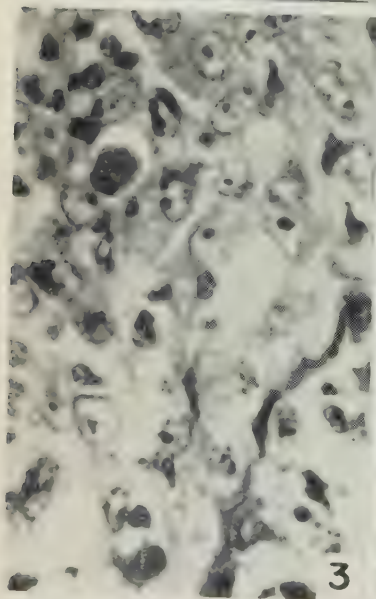
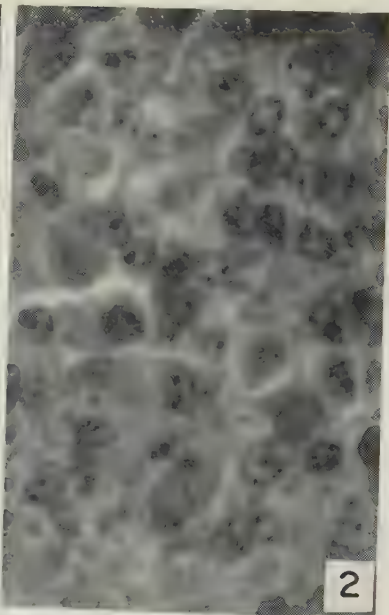
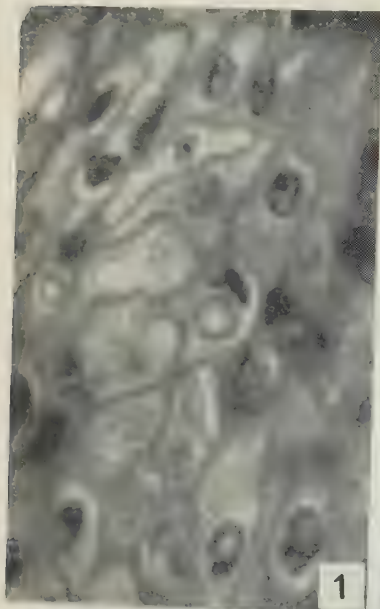
1° RÉCEPTIVITÉ DES GALLINACÉS ET DES COLOMBINS. — Ainsi que nous l'avons montré dans le travail précité, le virus que nous avons isolé a été inoculé avec succès à des pigeons et à des coqs ; or les souches qu'ont eues entre les mains d'autres expérimentateurs n'ont pas toujours manifesté la même polyvalence. Nous pensons qu'il faut voir là la conséquence d'une certaine diversité dans la réceptivité des races d'oiseaux appartenant à ces espèces plutôt que la manifestation d'affinités particulières aux virus considérés. Il ne faut pas oublier que, d'une manière générale, le pouvoir pathogène du virus de Kikuth pour le pigeon et la poule est faible ; c'est un caractère de quelque intérêt pour l'expérimentateur, mais sans retentissement dans le domaine de la pathologie et dans celui de l'épizootologie.

2° FORMATION DANS LES LÉSIONS DE CORPS DE BOLLINGER. — Reis et Nobrega trouvent des inclusions cytoplasmiques chez le poussin et le pigeon, mais Burnet et Elford n'en observent pas chez ce dernier ; quant à Eberbrek et Kayser, ils n'en voient ni chez le pigeon ni chez la poule.

Nous avons pu mettre ces formations en évidence dans les trois principales espèces sensibles : canari, pigeon, coq, ainsi que dans la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs de poule incubés. On en jugera facilement par l'examen de la planche jointe et la lecture de la légende qui lui correspond.

Les photographies ont été effectuées par notre collègue P. Manigault, tantôt avec un écran interférentiel et agrandissement secondaire à 1 000,





tantôt avec un écran Wratten n° 15 et agrandissement secondaire à 930, pour faire ressortir différents aspects de ces éléments.

*En résumé*, le virus de Kikuth que nous avons recueilli dans un foyer de variole du canari en France est apte à déterminer, chez le pigeon et chez le coq, la formation d'inclusions cytoplasmiques du type des corps de Bollinger. Les discordances, sur ce point, des constatations faites par divers expérimentateurs sont peut-être en rapport avec la faible réceptivité des oiseaux de ces espèces.

## BIBLIOGRAPHIE

[4] H. JACOTOT, A. VALLÉE et L. REINIÉ. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 90, 28.

## LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Peau de canari inoculé avec le virus de la maladie de Kikuth. Zone moyenne de l'épiderme hyperplasique avec hyperacanthose, qui comporte des corps de Bollinger, intracytoplasmiques, juxtanucléaires, acidophiles, mais souvent vacuolisés (trois sont visibles à la partie moyenne du cliché).

Coloration hémalum-éosine safran. Oculaire  $\times 6$ . Objectif  $\times 80$ . Immersion 1/12. Grandissement  $\times 670$ . Plaque orthochromatique. Ecran interférentiel et agrandissement secondaire à 1 000.

FIG. 2. — Même animal que le précédent, mêmes conditions de technique photographique, mais le cliché reproduit l'épithélium bronchique multistratifié hyperplasique et contenant de nombreux corps de Bollinger à structure homogène. A noter que les lésions observées dans l'épithélium de recouvrement des membranes chorioallantoïdes inoculées avec ce même virus ont eu exactement les mêmes aspects. Il ne nous a pas semblé, de ce fait, utile de reproduire les images observées.

FIG. 3. — Peau de coq inoculé avec le virus de la maladie de Kikuth. Deux images de corps de Bollinger situés à la limite d'une pustule siégeant à la partie externe du follicule d'une plume. Mêmes caractéristiques photographiques que les lam's précédentes, mais écran Wratten 15 et agrandissement secondaire à  $\times 930$ .

FIG. 4. — Peau de pigeon inoculé avec la même souche de virus. Nombreuses images de corps de Bollinger situés dans les cellules malpighiennes d'un follicule de plume. Mêmes caractéristiques que la figure précédente.



**SUR LE POUVOIR PATHOGÈNE  
DE *BACTERIUM VISCOSUM EQUI*  
POUR LES PETITS ANIMAUX DE LABORATOIRE**

par H. JACOTOT et A. VALLÉE

(avec la collaboration technique de MICHELLE MANCIER)

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.)

*Bacterium viscosum equi* (*Shigella viscosa*) est considéré comme peu et irrégulièrement pathogène pour les petits animaux de laboratoire. Ayant à étudier les propriétés d'un sérum contre la shigellose équine, nous nous sommes proposé de réexaminer cette question, et cela nous a conduits à essayer d'exalter la virulence du germe considéré par des artifices expérimentaux (1).

MATÉRIEL VIRULENT MIS EN ŒUVRE. — 1° Suspension en eau physiologique de cultures de deux jours sur gélose nutritive à raison de 5 ml d'eau par gélose inclinée en tubes de 17. La teneur en germes de la suspension est de l'ordre de 20 millions par ml.

2° Suspension additionnée de mucine : c'est la précédente à laquelle on a mélangé avec soin son volume de mucine au vingtième.

3° Suspension embryonnaire virulente : des œufs ayant neuf jours d'incubation sont inoculés par injection dans la cavité allantoïdienne d'une suspension très riche de *Bacterium viscosum* ; les embryons meurent dans les trente-six heures ; le microbe se retrouve, en plus ou moins grande abondance, dans toutes les parties de l'œuf, embryon, jaune et blanc ; on passe la totalité, moins le blanc, au broyeur électrique. Le titre microbien de la suspension est sensiblement plus élevé que celui de la suspension de culture sur gélose.

Toutes les inoculations ont été faites dans la cavité péritonéale. Administrées seules par cette voie, la mucine au 1/20 et la suspension d'œufs incubés non inoculés laissent les animaux indifférents.

ESSAIS SUR LA SOURIS BLANCHE. — Dans une première série d'expériences nous avons employé une souche de *Bacterium viscosum equi* de pouvoir pathogène relativement faible ; la suspension microbienne additionnée de mucine s'est révélée mortelle à la dose de 0,50 ml pour presque toutes les souris (94 p. 100), alors que, injectée sans adjuvant à dose double et à des doses supérieures, elle était sans effet sur la plupart des souris ; elle tuait encore inconstamment et toujours dans une faible proportion des cas lorsqu'on l'inoculait sans adjuvant, simultanément dans le péritoine à la dose de 0,50 ml et dans la veine à la dose de 0,25 ml.

(1) Nous remercions ici nos collègues, les docteurs Buttiaux et Thibault, qui ont bien voulu mettre à notre disposition des souches de *Bacterium viscosum equi*.

L'inoculation de la suspension embryonnaire de la même souche s'est montrée régulièrement mortelle aux doses de 0,25 et 0,50 ml.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons fait usage d'une souche de virulence élevée ; sans adjuvant, elle tuait deux souris sur quatre à la dose de 0,25 ml ; l'addition de mucine multipliait son pouvoir pathogène par 5.

ESSAIS SUR LE RAT BLANC. — Ils ont été effectués avec la souche la moins virulente ; il est apparu que la dose létale était approximativement de 1 ml, aussi bien avec la suspension de culture sans adjuvant qu'avec la suspension embryonnaire, mais des variations ont été observées d'une série à l'autre.

ESSAIS SUR LE COBAYE. — La même souche a manifesté vis-à-vis du cobaye une activité comparable ; sous forme de suspension virulente simple et sous forme de suspension embryonnaire, elle a tué tous les sujets inoculés avec 1 et 2 ml sans que la deuxième préparation parût supérieure à la première.

OBSERVATIONS GÉNÉRALES. — Dans les trois espèces envisagées, lorsqu'elle engendre des troubles caractérisés, l'inoculation intrapéritonéale déclenche presque toujours une septicémie mortelle entre la dix-huitième et la trente-sixième heure ; chez de rares sujets la mort survient plus tardivement, dans les limites d'une semaine. Et, d'une manière générale, la suspension simple agit aussi brutalement que les autres. A l'autopsie on ne relève pas de localisation infectieuse particulière, mais une vive congestion de la plupart des viscères. Les ensemencements permettent d'établir la présence de *Bacterium viscosum equi* dans le foie, la rate, le sang du cœur, la moelle osseuse. Les sujets qui ont résisté à une première inoculation restent, à quelques exceptions près, indifférents à l'inoculation ultérieure d'une dose sûrement mortelle. Le pouvoir pathogène spontanément manifesté par le microbe ou exalté par l'adjuvant peut être inhibé par l'antisérum correspondant. Parmi les échantillons de sérum que nous a donnés un cheval préparé à cet effet, l'un s'est montré doué d'un pouvoir protecteur assez fort : injecté sous la peau à la dose de 0,50 ml, il préservait 4 souris sur 5 des suites d'une inoculation virulente pratiquée le lendemain avec addition de mucine et qui tuait par ailleurs les 5 témoins ; à la dose de 0,10 ml il protégeait une souris seulement sur 5, mais les 4 autres mouraient avec un retard considérable : deux, onze jours après l'épreuve, et les deux autres dix-neuf jours (2).

EN RÉSUMÉ : le pouvoir pathogène de *Bacterium viscosum equi* vis-à-vis des petits animaux de laboratoire (souris, rat, cobaye) apparaît faible si l'on considère le nombre de microbes nécessaires pour les tuer (de l'ordre de quelques millions par voie péritonéale) ; il varie sensiblement, semble-t-il, d'une souche à l'autre ; mais sous ces réserves, il se caractérise d'une manière qu'on peut considérer comme satisfaisante sur le plan expérimental. L'addition de mucine aux suspensions microbiennes exalte nettement la virulence pour la souris.

(2) Nous adressons nos remerciements à notre collègue M. R. Corvazier, qui a largement contribué à la préparation de ce sérum.

## PARENTÉ MICROBIOLOGIQUE DES MOR FORESTIERS ET DES TOURBES ACIDES

par J. POCHON.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

L'horizon Ao des humus bruts forestiers (Mor) et les couches supérieures des tourbières acides présentent un certain nombre de caractères physico-chimiques et chimiques communs : pH acide, grande richesse en matière organique à rapport C/N élevé, dont la majeure partie est encore structurée. Du point de vue biologique ces deux types de terrain sont peu actifs ; la dégradation et la minéralisation des substances organiques y est extrêmement lente.

Cette inactivité biologique des Mor (opposée à l'activité des Mull et surtout des humus calciques) avait déjà été signalée [1]. Il nous a paru intéressant de comparer la microflore de ces Mor avec celle des tourbières acides. Retrouverait-on ici les mêmes analogies qu'au point de vue pédologique ?

Nous avons donc analysé la microflore de nombreuses tourbes acides d'origines diverses (dont nous donnons ici deux exemples : échantillons 1 et 2), ainsi qu'un nouveau Mor (échantillon 3) (1).

Ces trois échantillons présentent les caractères pédologiques suivants :  
*Tourbe* (1).

Tourbe à Sphaigne (Normandie).

pH = 4,5.

C = 34,8.

N = 2.

C/N = 17,4.

Matière organique = 29,9.

*Tourbe* (2).

Le Béliard, Gérardmer (Vosges).

Pins à crochet; *Sphagnum*, *Vaccinium uliginosum*, *Calluna vulgaris*, *Andromeda polifolia*.

pH = 3,6.

C = 58,3.

N = 1,27.

C/N = 45,9.

Matière organique = 99,1.

*Mor* (3).

Forêt de Rambervillier (Vosges).

Pente Sud-Ouest. Sol podzolique sur grès vosgien.

(1) Les échantillons 2 et 3, ainsi que les analyses chimiques correspondantes, nous ont été aimablement fournis par M. Duchaufour.

Pin sylvestre, restes de taillis de chêne rouvre, *Calluna vulgaris*, *Vaccinium myrtillus*, *Leucobryum glaucum*.

pH = 3,7.

C = 37,7.

N = 1,04.

C/N = 36,2.

Matière organique = 64,1.

Les méthodes d'analyse microbiologique sont celles habituellement utilisées dans notre laboratoire [2].

Les résultats sont résumés dans le tableau et les graphiques suivants.

	Tourbe(1)	Tourbe(2)	Mor(3)
Azotobacter	0	0	0
Clostridium fixateurs	50%	0	0
B.nitreuses(dil.limite)	$10^{-2}$	0	0
B.nitriques( " )	$10^{-1}$	0	0
Cellulolytiques aérobies	+	-	-
" anaérobies	$\pm$	+	+
Hémicellulolyse	$10^{-6}$	$10^{-1}$	$10^{-4}$
Réducteurs de sulfates	+	-	-
Microflore totale			
Bactéries	$47.10^6$	$8.10^3$	$2.10^7$
Actinomycètes	$1.10^6$	0	$4.10^4$
Champignons	$2.10^6$	$4.10^3$	$35.10^4$

Les analogies entre Mor et tourbes acides sont donc très frappantes.

Très faible activité biologique globale, se traduisant par une microflore totale très réduite, avec rupture de l'équilibre normal : peu ou pas d'Actinomycètes, rapport bactéries/champignons très bas (respectivement 23, 2 et 60 pour les échantillons 1, 2 et 3).

Très faible activité également des groupements physiologiques du cycle de l'azote et du carbone.

Les fixateurs sont absents, sauf parfois les *Clostridium* anaérobies. Ammonification, nitrification, dénitrification faibles ou nulles.

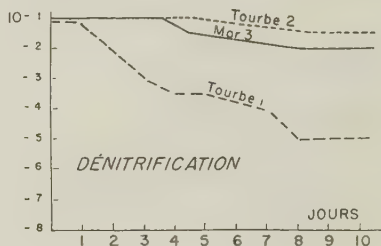
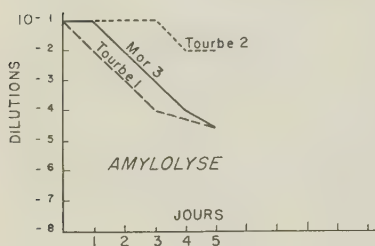
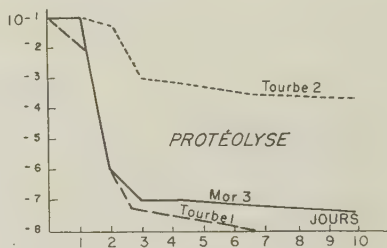
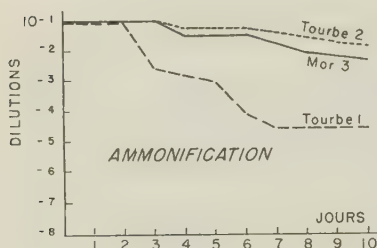
Cellulolyse faible et le plus souvent réduite aux seuls anaérobies. Amylolyse et hémicellulolyse beaucoup moins actives que dans les humus calciques, les Mull et les terres normales.

Tous ces caractères sont plus ou moins accentués selon les échantillons, ce qui laisse prévoir l'existence de formes de passage entre les sols tourbeux et les tourbes proprement dites d'une part, les tourbes et les Mor, d'autre part (formes de passage déjà connues du point de vue pédologique [Russell]).

Cette parenté biologique entre les Mor et les tourbes acides va donc de pair avec leurs caractères physico-chimiques et chimiques communs. Il est intéressant de préciser que le pH acide et la haute teneur en matière organique à rapport C/N élevé interviennent à la fois dans

leur caractérisation ; en effet, dans toute la série de classification des sols, une analogie d'acidité seule ou de richesse en matière organique seule n'entraîne pas de parenté pédo-biologique ou microbiologique.

Dans ce cas particulier des Mor et des tourbes acides, cette double parenté pédo-biologique et microbiologique nous semblait devoir être soulignée ; elle est un argument majeur (à ajouter à ceux déjà signalés, entre autres [3, 4]) en faveur de la signification réelle de la microflore en tant que caractère essentiel des sols parvenus à leur état d'équi-



libre biologique naturel. De plus elle pose avec acuité et précision le problème des relations de cause à effet entre la pédogenèse et la microflore pour un climax défini.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUCHAUFOUR et POCHON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 261.
- [2] POCHON et coll. *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson édit., Paris, 1954.
- [3] D. LAVERGNE. *Ann. agronom.*, 1955, 559.
- [4] DOMMERGUE. *V<sup>e</sup> Congr. Intern. Sci. Sol, Léopoldville*, 1954, **3**, 24.



## ÉTUDE AGROMICROBIOLOGIQUE D'UN PRÉLÈVEMENT DE LIMON DU NIL

par J. POCHON, L. STEEG, H. DE BARJAC et G. MILOVANOVITCH.

(Institut Pasteur, Laboratoire de Microbiologie du Sol.)

Si l'étude biologique des bactéries marines, tant dans les eaux elles-mêmes que dans leurs sédiments, est assez avancée, il n'en est pas de même en ce qui concerne les sédiments d'eau douce. Presque toutes les recherches concernant ces derniers ont été faites du point de vue de l'hygiène : mesure du degré de pollution par bactéries pathogènes dans les fonds de rivières, d'estuaires ou de lacs. L'aspect proprement biologique (recherche des groupes microbiens des grands cycles naturels) n'a suscité que peu de travaux : [1], Waksman [2], Cooper, Murrey et Kleerekoper [3].

Ayant eu à notre disposition un prélèvement de limon du Nil, dont on sait l'extraordinaire valeur fertilisante, il nous a semblé intéressant d'étudier cet aspect biologique, qui doit intervenir dans la valeur agromonomique du limon.

Le prélèvement a été fait dans un canal d'irrigation de la région d'Alexandrie, au mois de septembre.

Il se présente, macroscopiquement, comme une boue très dense, grisâtre, homogène, de structure extrêmement fine.

L'analyse pédologique sommaire a donné les résultats suivants :

pH = 7,2 ; matière organique = 8 % , azote organique = 0,6 % ; carbone organique = 1 % ; rapport C/N = 6,3 ; humus (méthode Chaminate) = 0,19 %.

Il s'agit donc d'un limon pauvre en matière organique, de rapport C/N très bas et à indice d'humification faible.

L'examen en microscopie directe d'une suspension au  $1/10^6$ , après coloration à l'érythrosine et la méthode de Gram standard, montre la présence de nombreux cocci et bâtonnets (dont un bon nombre sont sporulés) Gram positif et Gram négatif. L'aspect est beaucoup plus varié que celui d'une « terre ». Les microcolonies sont fréquentes (1).

La numération de la microflore totale (sur plaque de gélose — extrait de terre pour les bactéries, et sur plaques de gélose rose bengale — streptomycine pour les champignons) donne la répartition suivante :

Bactéries  $3.10^6$ /g limon sec ; champignons  $2.10^4$  ; levures  $8.10^4$ .

Si l'on additionne les champignons et les formes levures =  $1.10^5$ .

Le rapport bactéries/champignons = 30.

Il est à remarquer que le nombre de bactéries trouvé par numération semble très faible, comparé à la richesse observée en microscopie directe. Le fait est vraisemblablement en rapport avec la technique même de

(1) Toutes les techniques utilisées sont celles du *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, Pochon et coll., Masson édit., Paris, 1954.

numération sur plaque, qui élimine tous les anaérobies stricts. Or ces germes doivent être particulièrement nombreux dans un tel limon ; cette explication est corroborée par l'abondance des bâtonnets sporulés clostridiens et plectridiens vus en microscopie directe. Aussi le rapport bactéries/champignons, anormalement bas pour un sol à pH 7,2, n'a-t-il ici pas grande signification.

A noter aussi la pauvreté en Actinomycètes, défiant toute numération valable.

Nous avons ensuite procédé à l'analyse systématique des groupes fonctionnels des grands cycles biologiques naturels.

A. CYCLE DE L'AZOTE. — a) *Germes fixateurs de l'azote moléculaire* : les fixateurs aérobies (*Azotobacter*) ont été recherchés en limon moulé et sur silico-gel. L'une et l'autre technique montrent une très grande richesse en ces germes, puisque, sur silico-gel, 100 p. 100 des grains sont positifs. Une numération plus précise en milieu liquide donne un chiffre de l'ordre de 8000/g de limon sec. Il s'agit d'*Azotobacter* non pigmenté, vraisemblablement *A. chroococcum*.

Ce nombre élevé d'*Azotobacter*, et même leur présence, méritent d'être soulignés. En effet, cette présence dans un limon aussi mal aéré pourrait paraître paradoxale si l'on se référait seulement à la conception classique de l'aérobiose stricte de ces germes ; en réalité, des recherches récentes ont bien montré qu'ils tolèrent des tensions très réduites d'oxygène et que, dans ces conditions, les rendements de fixation sont parfois supérieurs (entre autres, Tschapek et Giambogi 1955 [4]). D'ailleurs les fixateurs anaérobies (*Clostridium*) sont également présents en grand nombre, mis en évidence sur limon moulé et sur silico-gel (80 p. 100 de grains positifs). Il s'avère donc que le limon du Nil est doué d'un pouvoir fixateur élevé, et ce fait est peut-être d'une grande importance pour sa valeur agronomique fertilisante.

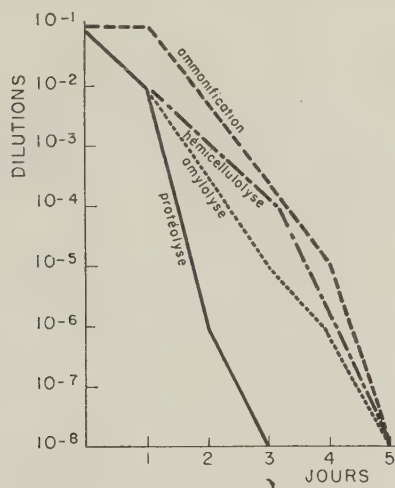
b) *Germes protéolytiques et ammonifiants* : les minéralisateurs de la matière organique azotée sont également actifs.

Le pouvoir protéolytique, mesuré sur gélatine, provoque la liquéfaction totale en trois jours jusqu'à la dilution  $10^{-8}$  (voir graphique 1).

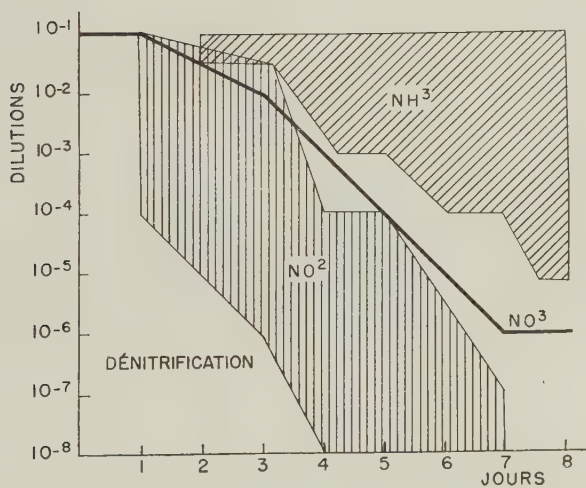
La minéralisation totale jusqu'au stade  $\text{NH}_3$  (ammonification proprement dite) est assez intense en limon moulé additionné de poudre de sang ; avec la technique à la tyrosine, on atteint la dilution limite de  $10^{-8}$  en cinq jours (voir graphique 1).

c) *La nitrification*, comme on pouvait s'y attendre dans un milieu aussi mal aéré, est loin d'avoir la même intensité. Cependant, elle n'est pas négligeable puisque, en milieu liquide, les dilutions limites sont respectivement de  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  pour les *Nitrosomonas* et *Nitrobacter*. Il est même remarquable que des taux aussi élevés soient atteints ; ils correspondent en effet à ceux normalement trouvés dans de bonnes terres arables.

d) L'activité *dénitrificatrice* se révèle élevée (voir graphique 2). Depuis que l'on sait que la microflore réductrice des nitrates n'est pas, comme on l'a longtemps cru, « pathologique », mais fait partie intégrante de toute microflore de terre normale (H. de Barjac [5]), il n'y a pas lieu de considérer ce fait comme défavorable ; il est au contraire le témoin d'une haute activité biologique.



Graphique 1.



Graphique 2.

B. CYCLE DU CARBONE. — a) Les *microorganismes cellulolytiques* sont peu nombreux.

En aérobose sur silico-gel-papier, 20 p. 100 de grains positifs en *Cytophaga*, 10 p. 100 en *Cellvibrio*.

En anaérobiose, très faible activité des mésophiles et des thermophiles.

Etant donné la nature de la matière organique du limon, à rapport C/N très bas, il n'y a rien là qui puisse surprendre, la cellulose entrant certainement pour une très faible part dans sa constitution.

b) Par contre, en opposition avec cette microflore très spécialisée, les microflores plus polyphages que sont les *amylolytiques* et les *hémicellulolytiques* sont abondantes et actives (voir graphique 1). Dans les deux cas, la dilution limite de  $10^8$  est atteinte en cinq jours.

C. CYCLE DU SOUFRE. — a) *Réducteurs de sulfates*. Les *Sporovibrio* cultivent, dans le milieu de Starkey, jusqu'à la dilution  $10^{-2}$  incluse, ce qui correspond à une activité assez grande, normale, pensons-nous, dans ce limon assez réducteur.

b) *Oxydants*. Si nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence d'oxydants du soufre élémentaire, les oxydants du soufre réduit ( $\text{SH}_2$ ) se sont, par contre, révélés assez nombreux : 67 p. 100 de grains positifs.

Il doit donc s'établir dans le limon une sorte d'équilibre entre production de  $\text{SH}_2$  (réduction des sulfates, minéralisation anaérobie du soufre organique) et oxydation de ce dernier.

CONCLUSIONS. — L'échantillon de limon du Nil analysé ne présente pas de caractères physico-chimiques et chimiques bien particuliers en dehors du rapport C/N très bas de sa matière organique. Ce caractère, joint à sa faible teneur en humus, fait rejeter toute hypothèse d'explication de sa valeur fertilisante par un apport en colloïdes humiques. Cette valeur pourrait bien ressortir, avant tout, de ses propriétés microbiologiques. En effet, biologiquement, il est intéressant de noter l'activité élevée de tous les groupements microbiens physiologiques du cycle de l'azote et du carbone, sauf des cellulolytiques. Il est deux points plus particulièrement à souligner : d'une part la parfaite harmonie des fonctions aérobie et anaérobie ; d'autre part la grande richesse, à laquelle il eût été paradoxal de s'attendre, en germes fixateurs d'azote moléculaire. Bref, l'équilibre et l'activité de la microflore agrobiologiquement intéressante doivent entrer pour une large part dans la valeur fertilisante de ce limon.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARPENTER. *Symposium of Hydrobiology*, Wisconsin, 1941.
- [2] WAKSMAN. *Ibid.*
- [3] COOPER, MURREY et KLEEREKOPER. *Rev. Canad. Biol.*, 1951, **12**, 457.
- [4] TSCHAPEK et GIAMBIOGI. *Arch. Mikrobiol.*, 1955, **21**, 376.
- [5] H. DE BARJAC. *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 440.

## APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE DE LA MICROFLORE DU SOL

par J. LAJUDIE et M.-A. CHALVIGNAC.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol.)

Dans l'état actuel des techniques d'études de la microflore du sol il est relativement facile d'apprécier l'activité des microflores minéralisatrices de l'azote organique jusqu'aux stades  $\text{NH}_3$  (ammonification) ou  $\text{NO}_3$  (nitrammonification) ; mais il s'agit là des « termes finals » de dégradation de l'azote organique.

Par contre, nous sommes beaucoup moins bien renseignés sur l'activité des germes responsables des « premiers stades » de dégradation des grosses molécules azotées, sur ce que l'on pourrait appeler la « microflore protéolytique » ; il n'y a pas lieu ici de tenir compte du terme final de cette dégradation, qui peut éventuellement être  $\text{NH}_3$  (d'où connexion intime entre cette microflore protéolytique avec celle de l'ammonification).

A la suite de recherches sur la protéolyse bactérienne dans le sol [1], l'un de nous avait proposé une méthode pour apprécier cette activité protéolytique [2] : numération de colonies liquéfiant le sérum coagulé. Avec certaines terres la lecture est souvent difficile du fait de la confluence des zones de liquéfaction ; de plus le sérum coagulé est apparu comme un milieu peu favorable pour un assez grand nombre de germes telluriques : il se fait donc une sélection (en particulier les *Pseudomonas*), et il devient difficile d'admettre qu'on ait alors une réponse vraiment quantitative.

Aussi, bien que cette méthode garde toute sa valeur pour l'isolement des souches, avons-nous cherché à mettre au point une méthode plus générale et plus pratique pour les analyses en série.

Utilisant la technique à la gélatine, substrat classique en bactériologie pour juger de l'activité protéolytique des germes, nous l'avons à la fois adaptée à la microbiologie du sol et rendue quantitative, sans toutefois prétendre arriver à une détermination du nombre absolu des bactéries protéolytiques.

*Principe* : Ensemencement, avec des suspensions-dilutions de terre, d'un milieu salin additionné de gélatine comme seule source de carbone et d'azote, et lecture de la liquéfaction en fonction du temps et des dilutions.

*Mode opératoire* : Après de nombreux essais (portant sur la concen-



tration en gélatine, l'addition d'extraits de terre), le milieu suivant a été adopté :

Gélatine .....	30 g
Solution saline standard [Winogradsky] (1).....	50 ml
Eau de source .....	950 ml

Ajuster à pH 7,3 ; répartir en tubes de Kahn, à raison de 2 ml par tube. Stériliser vingt minutes à 112°.

Les suspensions-dilutions de terre sont réalisées de  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$ , en changeant de pipette à chaque passage, ou en utilisant une seule pipette

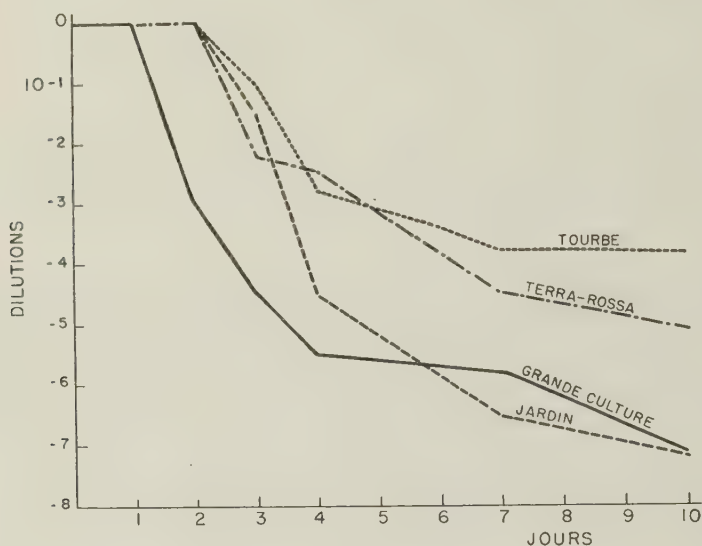


FIG. 1.

siliconée. Les tubes sontensemencés (3 par dilution, 0,5 ml par tube), le milieu étant à 30° environ, donc liquide. Mettre à l'étuve à 28°.

Les lectures sont faites les 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup>, 10<sup>e</sup> jours, en portant les tubes à la glacière à +2° pendant une heure et demie. Sont considérés comme positifs les tubes restant liquides et où s'est donc produit le premier stade d'attaque de la gélatine. On sait, en effet, que celui-ci se traduit essentiellement par une baisse de la viscosité, bien avant l'apparition d'acides aminés libres.

On peut alors tracer une courbe de la dilution limite active en fonction du temps : porter le temps en abscisses et les dilutions en

(1) Phosphate bipotassique, 5 g ; sulfate de magnésium, 2,5 g ; chlorure de sodium, 2,5 g ; sulfate ferrique, 0,05 g ; sulfate de manganèse, 0,05 g ; eau, 1000 g.

ordonnées ; pour plus de précision, calculer statistiquement, pour chaque jour, la dilution qui donnerait 50 p. 100 de tubes positifs ( $D_{50}$ ).

On ne peut évidemment pas prétendre qu'il s'agisse là d'une méthode vraiment écologique (milieu liquide, substrat « artificiel » par rapport au sol) ; cependant, l'ensemencement étant fait avec la microflore totale, les compétitions et les associations restent valables et la technique permet de juger de l'activité globale de la microflore sur un type de grosse molécule azotée, ce qui était le but recherché.

Les résultats ne présentent pas une valeur absolue (nombre exact de germes), mais relative, c'est-à-dire que les courbes permettent de comparer les terres entre elles (comme d'ailleurs la majorité des techniques de microbiologie du sol).

En effet, l'analyse d'un grand nombre de terres nous a permis de conclure que la méthode rend possible une différenciation de celles-ci en fonction de l'activité recherchée. A titre d'exemple, nous donnons les courbes obtenues avec quatre types de terres choisies aussi différentes que possible : une terre riche de jardin, une bonne terre de grande culture, une terre pauvre (terra-rossa de l'Estérel), une tourbe acide (pH = 4,5) [fig. 1].

La comparaison des courbes met en évidence une activité protéolytique élevée pour les terres de jardin et de grande culture, une activité faible pour la terra-rossa et la tourbe.

Ces résultats vont donc de pair avec l'activité biologique globale des terres (une analyse microbiologique totale a, de fait, été réalisée) et avec leur fertilité agronomique.

C'est l'argument majeur qui nous fait admettre la valeur pratique de cette méthode ; il nous semble donc qu'elle comble une lacune dans l'appréciation de l'activité des diverses flores zymogènes du sol et qu'elle peut prendre rang dans l'analyse microbiologique systématique des terres.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. POCHON et M.-A. CHALVIGNAC. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 690  
[2] M.-A. CHALVIGNAC. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 816.

## ESSAIS DE CULTURE *IN VITRO* DU VIRUS RABIQUE DES RUES

par J. VIEUCHANGE, C. VIALAT, J. GRUEST et R. BÉQUIGNON (\*).

(Institut Pasteur.)

Nous avons précédemment montré [1] que la méthode de culture des tissus en tubes roulants permet la culture du virus rabique fixe. Cette méthode n'ayant jamais été utilisée pour la culture du virus

(\*) Manuscrit reçu le 16 décembre 1955.

des rues, nous avons pensé qu'elle offrirait des facilités pour préciser, le cas échéant, les différences de comportement du virus rabique des rues et du virus fixe en culture de tissus. La technique des tubes roulants impose des changements répétés du milieu nutritif des cultures, ce qui permet de contrôler la virulence de ces liquides et d'être ainsi renseigné sur la libération du virus. En effet, dans les essais effectués par Webster et Clow [2], et par Plotz et Reagan [3], le virus a été retrouvé dans les cellules cultivées *in vitro*, mais aucune donnée n'était fournie sur la libération éventuelle du virus par les cellules.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS. — La souche employée est la souche « Ca » de virus des rues, qui a été isolée en 1953 à l'Institut Pasteur, dans le Service de la Rage. Cette souche a subi 4 passages sur le lapin par voie intracérébrale et sa durée d'incubation varie entre 14 et 18 jours. Cette souche est très négrigène.

Les tubes étaient ensemencés avec 0,2 ml d'une suspension cérébrale à des taux différents selon les essais (allant du 1/10 au 1/200 en poids). Les essais ont été effectués avec des cultures de tissus embryonnaires ou adultes. C'est ainsi qu'on a utilisé le cerveau d'embryon de souris, le rein d'embryon de cobaye, la cornée et la sclérotique du lapin adulte, et également le cerveau d'embryon de poulet.

Les changements du milieu nutritif ont été effectués à des intervalles de temps variant de 5 à 8 jours, selon l'état des cultures de tissus. Dans certains essais, en se référant à la longueur de la période d'incubation de la maladie expérimentale, les intervalles de temps séparant les changements de milieu ont été portés jusqu'à 30 jours, délai encore compatible avec la survie des cellules.

L'essai de virulence du liquide prélevé à l'occasion des changements du milieu nutritif était effectué avec le mélange des tubes de chaque série (trois à cinq selon les essais). Le matériel inoculé était préalablement centrifugé, afin d'éliminer toute cellule. Chaque contrôle de la virulence du milieu a été pratiqué sur plusieurs lapins, l'inoculation d'épreuve étant effectuée soit dans le cerveau soit dans les muscles du cou.

Dans un essai effectué avec des explants de cerveau d'embryon de souris, la virulence du milieu a été recherchée à l'occasion des 1<sup>er</sup>, 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> changements du liquide nutritif, c'est-à-dire aux 5<sup>e</sup>, 19<sup>e</sup>, 26<sup>e</sup> et 34<sup>e</sup> jours après l'ensemencement du virus dans les tubes roulants. Dans ces conditions, le prélèvement effectué le 5<sup>e</sup> jour s'est révélé virulent pour deux lapins inoculés ; de plus l'inoculation du milieu prélevé le 26<sup>e</sup> jour à l'occasion du 4<sup>e</sup> changement déterminait l'apparition d'une rage typique chez le lapin inoculé par voie intramusculaire, le lapin inoculé par voie cérébrale restant indemne. Il convient de noter d'ailleurs que, pour les animaux inoculés par voie cérébrale, la durée d'incubation de la maladie expérimentale était sensiblement raccourcie (11 jours) ; elle était de 29 jours à la suite de l'inoculation par voie intramusculaire. Par contre, les milieux nutritifs prélevés les 19<sup>e</sup> et 34<sup>e</sup> jours étaient dépourvus de virulence.

Dans un essai effectué parallèlement, des explants de cornée et de sclérotique de lapin adulte ont été cultivés en tubes roulants, puis

ensemencés avec le virus ; comme dans l'essai précédent, le milieu a été changé les 5<sup>e</sup>, 19<sup>e</sup>, 26<sup>e</sup> et 34<sup>e</sup> jours. Seul le milieu prélevé le 19<sup>e</sup> jour était virulent pour un lapin inoculé par voie intracérébrale (durée d'incubation : 15 jours), tandis que l'animal inoculé par voie intramusculaire restait indemne. Tous les autres prélèvements se sont montrés dépourvus de virulence.

Dans un autre essai effectué, lui aussi, avec des cultures d'explants de cornée de lapin, les résultats de l'ensemencement de ces cultures avec le virus des rues ont été entièrement négatifs : les liquides prélevés à l'occasion des changements de milieu, les 7<sup>e</sup>, 36<sup>e</sup> et 61<sup>e</sup> jours après l'inoculation du virus dans les tubes étaient dépourvus de virulence.

La possibilité d'obtenir la multiplication du virus rabique fixe dans des cultures d'explants de rein de mammifère en tubes roulants [4], nous a incités à utiliser ce type de cellules comme support éventuel de la culture du virus des rues. Deux séries de cultures de tissu rénal d'embryon de cobaye ont été ensemencées avec la souche « Ca » ; les changements de milieu ont été effectués pour une série de cultures, les 5<sup>e</sup>, 11<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jours, et pour l'autre série, les 8<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jours. Le matériel prélevé à ces divers moments était constamment dépourvu de virulence.

Enfin, dans un cinquième essai, le virus des rues a été ensemencé dans les cultures de tissu cérébral d'embryon de poulet. A aucun moment, le virus n'a été retrouvé dans le milieu de culture.

CONCLUSIONS. — La méthode de culture des tissus en tubes roulants a été utilisée pour la culture du virus de la rage des rues. Au cours des essais on a fait varier l'espèce animale d'où provenaient les tissus (souris, lapin, cobaye, poulet) ; la nature du tissu (embryonnaire ou adulte) ; l'organe à partir duquel étaient préparés les explants (cerveau, cornée, sclérotique) ; le type des cellules cultivées (fibroblastique ou épithélial). Les changements du milieu nutritif des cultures étaient effectués à des intervalles de temps variant selon les essais de 4 à 30 jours. Malgré les diverses conditions dans lesquelles les expériences ont été réalisées, il n'a pas été possible de cultiver avec régularité une souche de virus des rues : la virulence du milieu nutritif des cultures des tissus ensemencés avec cette souche de rage n'a pu être mise en évidence que par intermittence.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. BÉQUIGNON, J. GRUEST, C. VIALAT et J. VIEUCHANGE. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, 239, 1162.
- [2] L. T. WEBSTER et A. D. CLOW. *Science*, 1936, 84, 487.
- [3] H. PLOTZ et R. REAGAN. *Science*, 1942, 95, 102.
- [4] J. VIEUCHANGE, R. BÉQUIGNON, J. GRUEST et C. VIALAT. *Acad. Méd.*, séance du 7 février 1956.

## APPARITION D'AUTO-AGGLUTININE DE TITRE ÉLEVÉ CHEZ DES LAPINS OU DES CHIENS IMMUNISÉS A L'AIDE DE GLOBULES ROUGES PAPAINÉS

par A. LYQUEM et Y. CRÉPIN

(Institut Pasteur, Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins  
[Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

Le traitement enzymatique des globules rouges provoque des modifications qui sont décelables sérologiquement et qui semblent dans certains cas attribuables à de nouvelles propriétés antigéniques de ces globules.

On peut ainsi déceler, chez certains malades atteints d'anémie hémolytique acquise, un anticorps actif sur les globules traités par la trypsine ou la papaïne. Il est cependant exceptionnel de voir apparaître chez un animal immunisé un anticorps actif sur ses propres globules rouges traités au préalable par un enzyme.

Différents groupes d'expérimentateurs ont immunisé des cobayes ou des lapins à l'aide de globules rouges homospécifiques ou hétérospécifiques traités par le R. D. E., enzyme de *Vibrio cholerae*, mais ils n'ont obtenu d'anticorps que vis-à-vis de globules rouges hétérospécifiques traités, et non vis-à-vis des globules rouges de l'animal ayant élaboré l'anticorps.

Les modifications antigéniques produites par le R. D. E. sont assez proches de celles dues à l'action de virus du groupe de la grippe [4] chez les animaux immunisés et possédant de ce fait une panagglutinine de titre élevé ; les globules rouges traités par le R. D. E. sont éliminés plus rapidement que chez les animaux normaux (Ejby-Poulsen). Il en est de même chez les chiens immunisés contre le virus grippal PR8, auxquels on injecte des globules rouges soumis au préalable à l'action de ce virus [2], et chez les singes immunisés vis-à-vis de globules rouges traités par la papaïne (Ruggieri et Eyquem [3]). L'importance de ce phénomène dans le déclenchement des anémies hémolytiques acquises a conduit les différents expérimentateurs à pratiquer des immunisations à l'aide de globules rouges à antigénicité modifiée [4 et 5].

Dans l'ensemble, les anticorps obtenus ne possédaient qu'un faible titre qui pourrait expliquer l'absence de processus hémolytique concomitant. C'est pourquoi nous croyons intéressant de résumer certaines de nos observations.

Nous avons immunisé des lapins, des chiens et des rats à l'aide de suspensions de globules rouges homospécifiques préalablement papainés (séries 2 et 3). D'autres séries d'animaux ont reçu une solution d'enzyme en injections intraveineuses ou intrahépatiques. De plus, certains animaux immunisés comme ceux de la première série ont reçu



des injections d'antisérums cytotoxiques, au cours de l'immunisation (série 4). Des animaux témoins ont reçu les mêmes sérums cytotoxiques (série 5).

Pour ne pas soumettre chaque animal à des saignées répétées, les immunisations étaient pratiquées à l'aide de globules rouges d'animaux normaux de la même espèce. Il s'agissait donc d'iso-immunisation.

LAPINS. — Les lapins de la première série ont reçu en injection intraveineuse, 2 fois par semaine, une suspension à 20 p. 100 de globules rouges homospécifiques traités *in vitro*, à l'aide de l'enzyme protéolytique (Institut Pasteur) extrait de certaines papaïnes [6].

Au cours des examens hématologiques pratiqués pour surveiller l'apparition d'un processus hémolytique, nous avons remarqué que le sang de certains animaux présentait une auto-agglutination. Celle-ci était attribuable à la présence d'une cryoagglutinine dont le titre ne dépassait pas 1/24 à 4° C, titre qui est parfois rencontré chez des lapins normaux.

La recherche des anticorps vis-à-vis de globules rouges papaïnés a montré leur apparition en moyenne après la dixième injection à un titre de 1/25. Certains lapins élaborent à la douzième injection un anticorps de titre beaucoup plus élevé, compris entre 1/100 et 1/800, et atteignant même 1/1 600. Dans ce dernier cas, l'agglutination provoquée par cet anticorps réalise une prise en masse des globules rouges jusqu'à la dilution du sérum au 1/400. Cet anticorps n'est pas actif *in vitro* sur les globules rouges non traités de lapin normal. Il est actif à un titre identique vis-à-vis de globules rouges traités d'un lapin normal ou de ceux du lapin qui a élaboré cet anticorps.

Il est l'analogue expérimental de celui qui est connu en clinique humaine sous le nom d'auto-anticorps, décelable à l'aide de globules rouges traités par un enzyme protéolytique, mais il est exceptionnel que, dans ce dernier cas, le titre dépasse 1/200.

On pouvait se demander si cet anticorps était spécifiquement anti-papaïne ou s'il correspondait à un antigène décelé par la protéolyse. On sait cependant que l'immunisation du lapin n'est possible qu'à l'aide de papaïne formolée (Ramon). De plus, l'examen de l'action *in vitro* de ces anticorps nous a permis d'éliminer l'hypothèse d'un phénomène d'hémagglutination passive, car les globules rouges papaïnés de certaines espèces animales différentes ne sont pas agglutinés après mise en contact avec l'anticorps élaboré par les lapins. La comparaison de l'activité agglutinante vis-à-vis de globules rouges normaux et traités, nous a permis de classer les globules rouges en 4 catégories. Ainsi les globules rouges traités ou non traités de rat ne sont pas agglutinés. Par contre, les globules rouges humains O Rh négatifs qui ne sont pas agglutinés (à la dilution du 1/4) par le sérum de tous les lapins sauf un, le sont après traitement à 1/16 ; il en est de même des globules rouges de chien vis-à-vis d'un sérum et des globules rouges de mouton qui sont agglutinés au 1/32 et au 1/250. Dans le cas des chevaux, le traitement enzymatique semble au contraire faire disparaître les antigènes correspondant aux hétéro-hémagglutinines.

L'examen du sérum de certains lapins qui n'avaient pas élaboré

d'auto-agglutinines a cependant permis de déceler une hétéro-agglutinine active vis-à-vis de globules rouges traités de mouton.

Chez certains lapins, on observe l'apparition d'une sensibilité aux globules rouges traités, caractérisée par un choc mortel après l'injection intraveineuse de 2 ml de suspension à 20 p. 100 de globules rouges traités. Cette injection est, au contraire, parfaitement tolérée par d'autres animaux de la même série. La sensibilisation est apparue à la 4<sup>e</sup> injection (lapin 466), 5<sup>e</sup> injection (469), 7<sup>e</sup> injection (lapin 465), et 9<sup>e</sup> injection (lapin 453), chez des animaux qui ne possédaient pas d'anticorps sérologiquement décelables. Nous l'avons aussi constatée tardivement, trois mois après le début de l'immunisation, soit chez des animaux possédant une auto-agglutinine de titre élevé (1/800), soit chez ceux n'en possédant pas avec la technique utilisée.

Nous n'avons pas observé d'anticorps de ce type chez les animaux ayant reçu des injections intraveineuses ou intrahépatiques d'enzyme protéolytique ou de sérum cytotoxique.

CHIENS. — L'immunisation par voie intraveineuse de 4 chiens à l'aide de globules rouges traités de donneur compatible a permis d'observer chez l'un d'entre eux l'apparition d'un anticorps de même type, actif à 37° C jusqu'à la dilution de 1/800, vis-à-vis de globules rouges de l'animal élaborant l'anticorps.

De plus, cet anticorps est actif au 1/1 000 vis-à-vis de globules rouges traités de mouton, lorsque les globules rouges normaux de mouton ne sont agglutinés qu'au 1/2. Il possède la même activité vis-à-vis de globules rouges de lapin, bien que le titre en soit plus faible (1/250). Les globules rouges de chevaux gardent, au contraire, la même agglutinabilité. On peut donc estimer que les anticorps élaborés par les chiens iso-immunisés ne sont pas spécifiques de la papaïne. Ils semblent correspondre à un ou plusieurs antigènes dont certains motifs existent sur les globules rouges de différentes espèces.

	Globules Rouges Traités par la Papaïne							Globules Rouges non Traités - 37°						
	Cheval	Chien	Cobaye	Lapin	Mouton	ORh-	Rat	Cheval	Chien	Cobaye	Lapin	Mouton	ORh-	Rat
Anti Rh	32	32	—	64	—	—	128	8	—	—	64	—	—	32
Lapin normal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lapin 407 <small>ORTPE</small>	—	—	16	128	32	32	—	—	—	—	—	—	—	—
Lapin 451 <small>ORTPE</small>	32	—	64	2000	32	16	—	—	—	64	—	—	32	—
Lapin 449 <small>ORTPE</small>	—	—	64	500	—	16	—	64	—	32	—	64	—	—
Lapin 452 <small>ORTPE</small>	64	32	64	—	250	8	—	32	—	—	—	—	—	—
Lapin 461 <small>ORTPE</small>	—	—	—	—	32	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Chien 8 <small>ORTPE</small>	128	—	500	64	64	250	32	128	—	—	16	—	—	—
Chien 9 <small>ORTPE</small>	—	400	128	250	1000	64	128	—	—	—	—	—	—	32
Chien normal	—	32	64	8	—	32	32	—	—	—	—	—	—	—

RÉSUMÉ. — L'iso-immunisation de lapins ou de chiens à l'aide de globules rouges traités par de la papaïne permet d'observer chez le tiers des animaux en expérience, une agglutinine active à 37° C vis-à-

vis des globules rouges de l'animal élaborant l'anticorps préalablement soumis au même traitement enzymatique. Le titre de cet anticorps est compris entre 1/100 et 1/3 200.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. EYQUEM. *Rev. Hématol.*, 1955, **40**, 2, 436.
- [2] W. B. STEWART, C. W. PETENYI et H. M. ROSE. *Blood*, 1955, **40**, 228.
- [3] P. RUGGIERI et A. EYQUEM. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 994.
- [4] A. EYQUEM. *Congrès Internation. de Méd.*, XXX<sup>e</sup> Session, Alger, 1955.
- [5] A. EYQUEM. *V<sup>e</sup> Cong. Soc. Europ. Hématol.*, Fribourg, 1955 (sous presse).
- [6] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et A. EYQUEM. *Les groupes sanguins chez les animaux*, Flammarion édit., Paris 1953, 407 p.

**QUELQUES REMARQUES CONCERNANT  
LES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM  
QUI, EN MILIEU FAIBLEMENT ALCALIN,  
SE DÉPLACENT DANS LE COURANT ÉLECTRIQUE  
PLUS RAPIDEMENT QUE L'ALBUMINE**

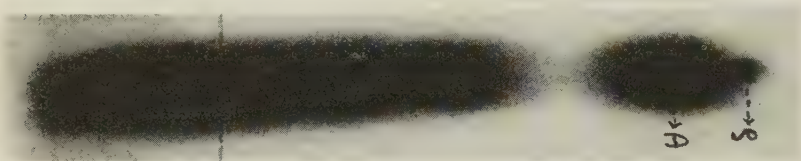
par G. SANDOR.

(*Institut Pasteur.*)

Parmi une série de sérums de chevaux antitoxiques qui nous a été envoyée de l'Institut Pasteur de Garches, nous en avons trouvé un qui contient à taux élevé une fraction protéidique migrant dans le courant électrique plus rapidement que l'albumine. Nous donnons ci-joint le diagramme obtenu par l'électrophorèse sur papier de ce sérum en même temps que nous rapportons brièvement l'histoire de cette fraction, qui est d'actualité.

Seibert et Nelson [1] sont les premiers à décrire une fraction protéidique du sérum humain qui migre plus rapidement que l'albumine et qui apparaît fréquemment à un taux sensible dans les formes graves de la tuberculose. Les auteurs supposent sa nature mucoprotéidique et l'appellent fraction X. Dans le sérum normal, le taux de cette fraction est trop faible pour se manifester nettement dans les diagrammes électrophorétiques ; pourtant, Hoch et Chanutin [2] la décrivent par une analyse particulièrement détaillée et estiment son taux à 0,07 à 0,33 p. 1 000. Grabar [3] de son côté la retrouve régulièrement par l'immunoélectrophorèse et l'appelle fraction  $\rho$ . Enfin, Baudouin, Lewin et Hillion [4], après avoir montré dans le liquide céphalorachidien la présence constante en proportion élevée d'une fraction migrant plus rapidement que l'albumine, la mettent aussi en évidence dans le sérum humain normal. Pour cela, la tache de l'albumine à partir d'électro-

phérogrammes sur papier est découpée en trois représentant respectivement les fractions lente, moyenne et rapide. Si l'on soumet à une deuxième électrophorèse les fractions rapides ou moyennes réunies après élution à partir de plusieurs diagrammes, une fraction migrant plus rapidement que l'albumine apparaît nettement, et cette fraction transporte des glucides et des lipides à taux élevé. Les auteurs, en revenant à la dénomination de Seibert, l'appellent fraction X. Mentionnons encore qu'il s'agit presque certainement de l'alpha-1-mucoprotéide que Weimer et ses collaborateurs [5] ont appelé fraction MP<sub>1</sub> et que Schmid [6], le retrouvant plus tard, dénomma glucoprotéide acide de poids molé-



Sérum du cheval antitoxique n° 336. Présence à un taux appréciable d'une fraction plus « rapide » que l'albumine (Electrophorèse sur papier).

laire faible. En effet, ce protéide a un point isoélectrique proche de pH 2 et, portant dès lors une charge électrique très élevée en milieu faiblement alcalin, a toutes les raisons de se déplacer dans le courant électrique plus rapidement que l'albumine.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. B. SEIBERT et J. W. NELSON. *J. biol. Chem.*, 1942, **143**, 29.
- [2] H. HOCH et A. CHANUTIN. *J. biol. Chem.*, 1953, **200**, 241.
- [3] P. GRABAR. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36**, 66.
- [4] N. BAUDOUIN, J. LEWIN et P. HILLION. *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1093.
- [5] H. E. WEIMER, J. W. MEHL et R. J. WINZLER. *J. biol. Chem.*, 1950, **185**, 561.  
— E. L. SMITH, D. M. BROWN, H. E. WEIMER et R. J. WINZLER. *J. biol. Chem.*, 1950, **185**, 569.
- [6] K. SCHMID. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 60.

## ACTION DU PARA-AMINO SALICYLATE D'ISONICOTYL HYDRAZIDE SUR LES MYCOBACTÉRIES

### II. — EXPÉRIMENTATION *IN VIVO*

par J. VIALLIER, J. BRUN et M<sup>lle</sup> S. LAGER.

(Faculté de Médecine et Institut Pasteur, Lyon)

Nous avons étudié précédemment [1] l'action bactériostatique exercée *in vitro* par le pasiniazide sur différentes souches de Mycobactéries. Complétant cette expérimentation, nous avons recherché comparative-ment l'activité bactériostatique exercée par le sérum sanguin de sujets recevant ce produit sur une souche de bacille tuberculeux sensible ou résistante à l'isoniazide. La technique utilisée a été exposée par ailleurs [2]. Une goutte d'une culture au douzième jour en Dubos liquide de la souche choisie, sensible à 0,1 µg ou résistante à 20 µg d'isoniazide et sensible à 1 µg de PAS, a été ensemencée dans des tubes de milieu de Youmans, sérum de cheval liquide, contenant le sérum à tester en quantités croissantes. Par comparaison, l'ensemencement dans les mêmes conditions d'une série de milieux additionnés d'isoniazide à des concentrations connues permettait de noter l'activité de cette substance. Le pouvoir bactériostatique du sérum a été lu après douze jours de séjour à l'étuve à 37° et exprimé par équivalence à la concentration d'isoniazide ayant empêché tout développement macroscopique. En ce qui concerne l'activité exercée sur la souche iso-résistante, nous avons noté la concentration du sérum la plus faible ayant empêché toute pousse du bacille ou la plus forte utilisée étant restée sans action. Le tableau I indique les résultats de 21 dosages en fonction de la dose de pasiniazide administrée par voie orale et du temps écoulé depuis l'absorption du médicament. Dans l'ensemble, le pouvoir bactériostatique sur la souche sensible varie avec la dose de médicament et l'ancienneté de son absorption. L'activité exercée sur la souche INH-résistante et PAS sensible a été irrégulière, soumise à de nombreuses variations individuelles, et ne va pas de pair avec la concentration du sérum en isoniazide.

Une expérimentation superposable a été effectuée sur le cobaye, recevant par voie orale une quantité déterminée de pasiniazide ou d'isoniazide à titre de contrôle. L'animal a été sacrifié, un laps de temps déterminé après l'ingestion. Son sang et des fragments de viscères ont été recueillis. L'activité bactériostatique a été recherchée comparative-ment sur une souche iso-sensible et sur une souche iso-résistante avec le sérum sanguin et le liquide obtenu après filtration sur bougie L3 du broyat de 1 g de viscère pour 2 cm<sup>3</sup> d'eau distillée stérilisée et contact quarante-huit heures à 0°. Les ganglions proviennent de cobayes tuberculés. Les résultats ont été consignés dans les tableaux II et III.



TABLEAU I. — Activité bactériostatique exercée par le sérum sanguin de sujets recevant du pasiniacide par voie buccale, sur une souche sensible et sur une souche résistante à l'isoniazide.

Sérum	Dose totale de PT en mg. par jour et par kg. du poids	Dernière prise en mg.	Temps écoulé depuis la dernière prise	Activité du sérum en I.N.H. sensible $\mu$ g.	Activité du sérum sur souche résistante (1)
Mo.Cl.	6	200	3h.30'	0,25	1/2 +
Mo.Cl.	6	200	3h.30'	0,25	1/4 0
Ba.Ro.	9	300	12h.	1	1/2 0
Ba.Ro.	9	300	3h.	3	1/4 +
Fa.Au.	10	100	5h.		
		200	1h.	0,25	1/2 +
Be.El.	9	200	1h.30'	0,5	1/4 0
"	9	200	2h.30'	0,25	1/4 0
Eg.Ad.	10	200	1h.	0,25	1/4 +
Eg.Ad.	10	200	2h.	0,125	1/4 +
Eg.Ad.	10	200	12h.	0	1/2 0
Ve.Ja.	10	200	1h.	0,5	1/2 0
Ug.Ma.	11	200	1h.	1	1/2 +
Ug.Ma.	11	200	1h.	1	1/8 +
		200	5h.		
		200	40'	2	1/4 0
Vo.Da.	15	200	2h.	0,5	1/2 +
Vo.Da.	15	200	4h.	0,5	1/2 0
Vo.Da.	15	200	1h.	0,5	1/4 0
Vo.Da.	15	300	5h.	1	1/2 0
		200	2h.		
Ca.De.	17	200	2h.30'	1	1/8 0
Ca.De.	17	200	2h.	2	1/2 0
Ch.		200	2h.30'	1'	1/4 +

(1) Nous avons noté la concentration la plus forte n'ayant aucune activité, ou la plus faible ayant manifesté une activité.

TABLEAU II. — Activité bactériostatique exercée par le sang et les viscères de cobaye recevant de l'isoniazide par voie orale, sur une souche sensible et sur une souche résistante à l'isoniazide.

COBAYES TÉMOINS AYANT REÇU DE L'I.N.H.

Cobayes Doses d'I.N.H. en mg. par kg. de poids	Temps écoulé après la prise	Dosages effectués avec souche I.N.H. sensible				Dosages effectués avec souche I.N.H. résistante			
		Quantités en $\mu$ g. d'I.N.H. contenues dans 1 cc. de produit Sang: 1 cc. Viscères: 1 gr. dans 1 cc.							
		Sang	Foie	Poumon	Ganglion inguinal	Sang	Foie	Poumon	Ganglion inguinal
95	1 h.30'	4	1	1		0	0	0	
100	1 h.40'	8		2		0		0	
105	1 h.40'		4		1		0		0
115	1 h.30'	8				0			
120	1 h.30'			1				0	

5 cobayes ont reçu, à titre de témoins, de l'isoniazide. L'activité bactériostatique recherchée sur des souches iso-sensibles a été impor-

TABLEAU III. — Activité bactériostatique exercée par le sang et les viscères de cobaye recevant du pasiniazide par voie orale, sur une souche sensible et sur une souche résistante à l'isoniazide.

Cobayas Dose de PI en mg. par kg de poids	Temps écoulé après la prise	DOSAGES EFFECTUÉS AVEC UNE SOUCHE I.N.B. SENSIBLE										DOSAGES EFFECTUÉS AVEC UNE SOUCHE I.N.B. Résistante				
		Quantités en c.c. d'I.N.B. contenues dans 1 cc. de produit Sang 1 cc. Viscères 1 gr. dans 1 cc.					Quantités théoriques en mg. de P.A.B. sédiments correspondantes dans le P.I.					Les taux indiqués expriment les dilutions du produit (Sang 1 cc, Viscères 1 gr. dans 1 cc) qui ont inhibé toute pousse du bacille				
		Sang	Foie	Rate	Poumon	Ganglions lombré-lingual	Sang	Foie	Rate	Poumon	Ganglions lombré-lingual	Sang	Foie	Rate	Poumon	Ganglions lombré-lingual
150	30'	1	2		0,5		1,4	2,8		0,7		1/8	1/16		1/4	
150	1h.30'	16			4	2	22			5,6	2,8	1/16		1/8	1/8	1/8
165	1h.	16	6	4	6		22	8,4		5,6	8,4	1/8	1/6	1/16	1/12	
165	2h.30'	1				0,25	0,25				0,35	1/16		1/16	1/16	
175	35'	0,5	2	8	1		0,7	2,8		11,2	1,4	1/2	1/16	1	1/2	1/8
190	2h.	16			4	2	22			5,6	2,8	1/2		1/2	1/8	
220	1h.				8	8				11,2		1/16		1/8	1/4	1/32
225	1h.30'	4	1		1		5,6	1,4		1,4		1/16	1/4	1/4		
240	1h.40'	8	1		2		11,2	1,4		2,8		1/16	1/2		1/2	
250	1h.35'	8			4		11,2			5,6		1/8			1/4	
250	1h.30'				4					5,6					1/4	
275	1h.40'		2		16			2,8		22	2,8		1/4		1/8	1/8
320	1h.45'	8			2	1	11,2			2,8	1,4	1/16		1/8	1/8	1/16
330	2h.40'	1	16		8		1,4	22		11,2		1/16	1/8		2/8	

tante, alors que cette même activité testée avec des bacilles INH-résistants a été nulle (tableau II).

14 cobayes ont reçu de la même façon du pasiniazide à des taux variant de 50 à 330 mg par kilogramme. Ils ont été sacrifiés de trente minutes à deux heures quarante après cette absorption. Le tableau III indique la quantité d'isoniazide active et la quantité théorique de PAS contenue dans les prélèvements, puis l'activité bactériostatique exercée sur une souche iso-résistante et sensible au PAS représentée par la plus forte dilution du sérum ayant empêché toute pousse macroscopique. L'activité a été indéniable, mais elle est restée assez faible et dans l'ensemble inférieure à l'activité théorique que l'on pouvait espérer d'après la concentration en PAS. Il n'y a pas eu une proportionnalité constante entre cette activité bactériostatique et la teneur théorique de l'échantillon en para-amino-salicylate de sodium.

Nous avons voulu enfin étudier l'activité antituberculeuse du produit chez des cobayes inoculés avec des souches isoniazido-résistantes. L'activité pathogène souvent faible de ces bacilles et la difficulté d'obtenir une généralisation des lésions tuberculeuses, nous ont fait recourir à la technique de l'inoculation intradermique au cobaye d'une quantité soigneusement contrôlée de bacilles INH-résistants à plus de  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Cette méthode, proposée par Daddi et Lucchesi [3] pour déceler la streptomycino-résistance des bacilles tuberculeux, a été étudiée par Gernez-Rieux, Sevin et M<sup>lle</sup> Cheffet [4] et par Et. Bernard et B. Kreis [5]. Chaque cobaye a été inoculé avec 4 souches différentes dans les territoires axillaires et inguinaux et chaque souche inoculée à 4 cobayes. 12 souches ont été utilisées et les cobayes répartis en quatre lots : témoin, traité par le pasiniazide, traité par l'isoniazide, traité par le PAS. Les antibiotiques ont été administrés aux animaux par voie orale, en une seule ingestion journalière, à raison de six jours par semaine durant un mois. Les doses utilisées par kilogramme de poids ont été respectivement de 40 mg de pasiniazide, 20 mg d'isoniazide et de 28,8 mg de PAS sodique, ce qui représente, même en tenant compte d'une certaine perte de produit, des doses importantes. Les animaux ont été observés pendant trente jours afin d'éviter une erreur d'interprétation, soit que l'ulcération d'une souche partiellement ou incomplètement résistante ait mis longtemps à apparaître, soit qu'une souche sensible ait provoqué un chancre évoluant progressivement vers la cicatrisation. Ces animaux ont été examinés au huitième, quinzième, vingt et unième jour et sacrifiés au trentième. A l'autopsie enfin, nous avons tenu compte soigneusement, outre de l'ulcération cutanée, de la caséification locale et de l'atteinte plus ou moins importante du ganglion lymphatique correspondant au territoire cutané inoculé. L'observation au huitième, quinzième, vingt et unième, trentième jour ne nous a pas permis de constater de différence dans l'évolution des animaux traités par le pasiniazide, l'isoniazide, le PAS seul et les témoins, et l'autopsie effectuée au trentième jour ne nous a pas permis de noter une action du pasiniazide, pas plus du reste que du PAS seul, aux concentrations équivalentes.

Les conclusions qui découlent de cette expérimentation *in vivo* confirment celles qui avaient été énoncées, lors de nos essais bactériostatiques *in vitro*. Le pasiniazide agit d'une façon régulière et cons-

lante sur les Mycobactéries INH-sensibles. Sur les Mycobactéries INH-résistantes et PAS sensibles, l'activité est irrégulière et variable. L'expérimentation, effectuée sur des cobayes inoculés avec des souches INH-résistantes, n'a pas permis au produit, dans les conditions où nous nous sommes placés, de manifester une activité quelconque.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. VIALIER et M<sup>lle</sup> R.-M. CAYRÉ. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 114.
- [2] J. BRUN, J. VIALIER et SUZANNE LAGER, *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 359
- [3] G. DADDI et M. LUCCHESI. *Ann. Ist. Carlo Forlanini*, 1948, 11.
- [4] CH. GERNEZ-RIEUX, A. SEVIN et M<sup>lle</sup> CHEFFET. *Revue Tub.*, 1949, **43**, 326.
- [5] ET. BERNARD et B. KREIS. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 764.

## ACTIVITÉ CATALASIQUE ET SENSIBILITÉ A L'ISONIAZIDE DES MYCOBACTÉRIES PATHOGÈNES

par J. VIALIER et M<sup>lle</sup> R.-M. CAYRÉ.

(Institut Pasteur. Lyon.)

Les Mycobactéries, comme beaucoup d'autres microbes, sont normalement pourvues d'une catalase. Récemment, G. Middlebrook [1] a montré que les Mycobactéries pathogènes résistantes à l'isoniazide, perdaient partiellement ou en totalité leur activité catalasique. Se basant sur cette propriété, Lenore, R. Peizer et Daniel Widelock [2] ont décrit un test colorimétrique permettant d'apprécier l'activité catalasique des souches isolées de sujets traités par l'isoniazide et ils proposent de déterminer ainsi, du moins approximativement, le degré de résistance de la souche à l'isoniazide et sa virulence pour le cobaye. Cette technique de réalisation aisée et rapide pourrait se substituer aux procédés classiques de recherche de la sensibilité. Dans un travail ultérieur [3], ces auteurs apportent la comparaison de la résistance à l'isoniazide, de la virulence pour le cobaye et de l'activité catalasique de 45 souches isolées de l'expectoration de malades traités par cet antibiotique. Ils admettent en conclusion l'existence de relations importantes entre ces éléments, mais avec des discordances, en particulier en ce qui concerne résistance à l'isoniazide et activité catalasique. J. Viallier et M<sup>lle</sup> R.-M. Cayré [4] ont trouvé que, si la majorité des souches de Mycobactéries pathogènes qui viennent d'être isolées de l'homme et qui ont acquis une isoniazido-résistance « globale » élevée, ont perdu leur activité catalasique, ceci n'est pas toujours le cas et il n'y a pas toujours perte de la virulence pour le cobaye. Certaines souches correspondent en effet à un mélange de germes sensibles ou résistants, à activité catalasique divergente.

Une nouvelle expérimentation a porté sur 451 souches isolées de lésions humaines, en particulier d'expectorations de sujets atteints de

tuberculose pulmonaire, traités ou non par l'isoniazide. Nous avons recherché l'activité catalasique, selon la technique que nous avons indiquée [4] ; puis nous avons utilisé cette même culture poussée en milieu dépourvu d'isoniazide pour ensemencer une galerie de tubes de milieux additionnés d'antibiotique en quantité variable, afin de déterminer la sensibilité des bacilles. Dans ces conditions, nous avons trouvé 98 souches à catalase négative. Nous n'avons retenu comme catalase négatives que celles pour lesquelles il n'y avait aucune décomposition de l'eau oxygénée. Ces 98 souches se répartissent ainsi : 62 résistantes à plus de 20  $\mu\text{g}$ , 21 de sensibilité comprise entre 1 et 20  $\mu\text{g}$ , 15 de sensibilité supérieure à 1  $\mu\text{g}$ . Il faut signaler en outre que 15 souches catalase positives étaient résistantes à plus de 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Dans de nombreux cas, la souche isolée correspond en effet à un mélange de bactéries sensibles et insensibles et l'activité catalasique des premières, développées en un milieu privé d'isoniazide, conduira à l'interprétation inexacte de la sensibilité de la souche. L'inverse peut être exact : dans 15 cas, avons-nous dit, bien que la recherche de la catalase en milieu dépourvu d'antibiotique ait été négative, les souches furent sensibles à 0,1  $\mu\text{g}$ . Nous en avons cherché les raisons. Pour deux, les repiquages ultérieurs furent difficiles et durent être refaits ; trois provenaient de cobayes inoculés avec une souche originelle iso-résistante, repiquée trois fois dans un milieu contenant 20  $\mu\text{g}$  d'isoniazide ; l'animal n'avait pas été traité durant sa survie.

Deux souches n'étaient pas parfaitement sensibles à l'isoniazide, puisque leur sensibilité était comprise entre 0,5 et 1  $\mu\text{g}$  ; elles provenaient de malades traités. Une autre enfin avait été isolée d'une malade longuement traitée, les bacilles isolés étant habituellement résistants. Il nous reste donc en définitive 7 souches pour lesquelles la recherche de la catalase fut négative et la sensibilité à l'isoniazide à 0,05  $\mu\text{g}$ , et pour lesquelles nous n'avons pas de renseignements suffisants.

En *conclusion*, s'il y a des relations étroites entre résistance à l'isoniazide et activité catalasique, la recherche de cette dernière ne peut permettre de remplacer le test de la sensibilité à l'isoniazide. Les souches isolées de produits humains correspondent, en effet, à des mélanges de germes de sensibilité et d'activité catalasique différentes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. MIDDLEBROOK. *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
- [2] LENORE, R. PEIZER et DANIEL WIDELock. *Am. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 305.
- [3] LENORE, R. PEIZER et DANIEL WIDELock. *Am. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 246.
- [4] J. VIALIER et M<sup>lle</sup> R.-M. CAYRÉ. *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 734.



## ESSAI DE TRANSMISSION DU VIRUS DE NEWCASTLE A DES VERTÉBRÉS INFÉRIEURS

par L. PLACIDI.

(Institut de Biologie animale, Rabat, Maroc.)

Nous avons recherché la réaction à l'inoculation intracérébrale du virus de Newcastle de deux espèces de tortues (*Testudo graeca* et *Clemmys leprosa*) et de trois espèces de couleuvres (*Natrix natrix*, *Natrix viperina* et *Malpolon monspessulana*).

Nous avons utilisé pour cela deux souches de virus parmi celles que nous avons isolées au Maroc ; l'une d'elles a acquis expérimentalement un pouvoir pathogène régulier pour le cobaye.

Nous avons injecté dans l'encéphale, après perforation de la boîte crânienne, 2 à 3/10 de centimètre cube d'une dilution concentrée de broyat d'encéphale de poule morte de la maladie expérimentale ou du liquide embryonnaire brut provenant d'un œuf inoculé le dixième jour.

Nos essais ont porté sur une quarantaine de tortues et sur 20 serpents.

Des différences de réceptivité existent certainement entre ces diverses espèces ; mais elles sont difficilement appréciables ; elles n'apparaissent pas vis-à-vis d'une souche plutôt que d'une autre. Il est impossible de noter le moindre changement dans l'habitus des animaux infectés ; quelques-uns cependant succombent, et il semble alors possible d'attribuer cette fin à l'inoculation virulente.

Cependant la tortue terrestre (*Testudo graeca*) ne succombe que rarement, tandis que la mort est communément observée après l'inoculation dans l'encéphale pour *Clemmys leprosa* et les diverses couleuvres ; en ce qui concerne les délais de la mort, il paraît y avoir une notable différence entre la tortue et le serpent.

C'est ainsi, par exemple que pour les tortues d'eau, dans un premier essai, sur 5 inoculées, 3 succombent le seizième, le dix-neuvième et le vingt et unième jour ; dans un autre, sur 2 inoculées, une meurt le dix-septième jour. Sur 3 nouvelles tortues réinoculées, une succombe le huitième jour.

Sur quatre couleuvres injectées dans le cerveau, 3 succombent le neuvième et le onzième jour ; la quatrième survit. Le broyat d'encéphale est réinoculé dans les mêmes conditions à deux autres, qui meurent le septième jour.

La présence du virus a été régulièrement vérifiée par la réinoculation des broyats d'encéphale en eau physiologique, à la fois à des poules neuves, à des poules vaccinées, à des œufs embryonnés.

Les poules neuves meurent régulièrement, les vaccinées résistent ; les embryons ne sont infectés que dans une très faible proportion. Les liquides embryonnaires sont normalement agglutinants : l'hémagglutination est inhibée par un sérum anti.

Si l'on reprend dans les mêmes conditions les encéphales du deuxième passage, le résultat est encore le même.

On n'en conclut cependant pas que le virus s'est développé dans l'organisme des reptiles, mais on constate qu'il y conserve sa virulence, ce point étant vérifié par l'inoculation à la poule adulte. Cette conservation dans l'encéphale de la tortue ou de la couleuvre peut être de longue durée. Nous avons pu mettre le virus en évidence sept mois après l'inoculation dans l'encéphale de la première et quatre-vingts jours après dans celui de la couleuvre. Cette longue conservation dans l'encéphale de la tortue a été observée pour d'autres virus, notamment le virus rabique [1]. Elle paraît être assez caractéristique de la résistance relative aux virus des vertébrés inférieurs en général.

Il est intéressant de noter que les sérums de ces vertébrés inférieurs possèdent vis-à-vis de certains virus des propriétés inhibitrices et neutralisantes, très variables sans doute avec l'espèce, l'individu et peut-être suivant la saison, mais parfois élevées.

Nous avons vérifié ce point pour le virus de Newcastle et le virus rabique fixe, et nous y reviendrons dans une note séparée.

Ne manquons point de rappeler les recherches dans ce domaine de M. et M<sup>me</sup> Atanasiu [2] qui ont transmis le virus de Newcastle à un poisson sélacien (*Scyllium canicula*), et celles de Reagan, Qureshi et Brueckner [3], qui réussissent à infecter 75 p. 100 des œufs embryonnés avec le virus de Newcastle passé sur tortues.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. REMLINGER et J. BAILLY. *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **408**, 466 et 1932, **410**, 421.
- [2] P. ATANASIU et I. ATANASIU. *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **87**, 393.
- [3] R. L. REAGAN, S. H. QURESHI et A. L. BRUECKNER. *Vet. Med.*, 1953, **48**, 493.

## OBTENTION DE FORMES NAINES (FORMES L) DES BACTÉRIES SUR UN MILIEU PÉNICILLINÉ ENRICHÍ EN SELS MINÉRAUX

par JEAN LAVILLAUREIX.

(Institut d'Hygiène, Faculté de Médecine, Strasbourg.)

La transformation L a été observée chez de nombreuses espèces bactériennes et semble être un phénomène général. L'obtention expérimentale des formes naines est le plus souvent difficile. Seuls de rares

germes, tels certains *Proteus*, présentent la transformation L avec une fréquence relativement grande. Même à l'intérieur d'une espèce donnée, tous les germes ne sont pas également aptes à donner naissance à des formes naines.

Bien entendu ceci ne s'applique qu'au cycle L vrai, et non pas au cycle L incomplet constitué par des formes géantes qui évoluent soit vers la réversion en bactéries, soit vers la lyse.

Il est probable que notre ignorance presque complète du métabolisme de ces organismes est responsable de ces échecs.

Classiquement, on préconise l'utilisation de milieux solides, à faible concentration en gélose, à pH alcalin, enrichis en protéines animales. Le plus souvent la transformation est obtenue en présence de pénicilline, parfois cependant la DL-méthionine donne de meilleurs résultats, ainsi que nous avons pu le montrer après Dienes [3].

Le rôle des protéines animales indispensables à la croissance des formes L n'est pas élucidé. D'après Medill et O'Kane [4], l'adjonction de ces substances empêcherait l'action inhibitrice de facteurs présents dans les milieux de culture. Avec Tulasne et Terranova [4], nous avons montré que certaines vitamines du groupe B pouvaient remplacer cette action favorable des protéines animales.

Récemment, Sharp [2] a obtenu la transformation L de streptocoques en enrichissant le milieu classique en Clna.

Par l'étude de nombreux milieux, nous essayons de faciliter l'obtention expérimentale de formes naines des bactéries. Nous rapportons ici les résultats encourageants que nous avons obtenus en ajoutant à nos milieux de culture une solution saline balancée.

MILIEU EMPLOYÉ. — Gélose Difco à l'extrait de cœur enrichie avec 20 p. 100 d'ascite pénicillinée à 1.000 U/cm<sup>3</sup>, additionnée de 20 p. 100 de solution saline balancée. Cette solution saline est la solution concentrée de Hanks non bicarbonatée :

NaCl .....	80 g	PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> .....	0,6 g
KCl .....	4 g	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	0,6 g
SO <sub>4</sub> Mg .....	2 g	Glucose .....	10 g
CaCl <sub>2</sub> .....	1,4 g		

pour 1 l d'eau bidistillée.

RÉSULTATS. — Nous distinguons deux groupes de germes parmi tous ceux sur lesquels nous avons essayé la transformation expérimentale.

1° Dans un premier groupe nous mettons les germes qui, dans les conditions expérimentales habituelles, ne nous ont pas donné la transformation L. Ces germes sont les suivants :

6 Streptocoques (4 verdissants, 2 entérocoques) ;

3 *Hemophilus pertussis* ;

3 *Pasteurella* (2 *pestis*, 1 *pseudo-tuberculosis*) ;

12 *Salmonella* (7 *typhi-murium*, 1 *typhi*, 1 *para-A*, 3 *para-B*) ;

8 *Escherichia coli* ;

3 Vibrions des eaux.

Sur ces 35 germes, qui, dans les conditions normales d'expérience, ne donnent pas de formes naines, nous avons obtenu sur notre



milieu additionné de solution saline la transformation L pour 12 germes, à savoir :

- 2 Streptocoques ;
- 2 *Pasteurella pestis* ;
- 5 *Salmonella typhi murium* ;
- 3 Vibrions des eaux.

Ces 12 souches nous donnent des colonies L typiques. Macroscopiquement ces colonies ont l'aspect classique des colonies à centre incrusté. L'aspect microscopique est tout à fait caractéristique. Ces colonies sont repiquables en série.

Donc, première conclusion : effet bénéfique de l'addition de solution saline balancée sur l'obtention de formes naines (formes L) à partir de germes qui n'en donnent pas dans les conditions expérimentales habituellement employées.

2° Dans le deuxième groupe, au contraire, nous avons des germes qui donnent avec une grande fréquence des formes naines sur milieu classique, soit 7 *Proteus*, et des germes qui nous ont donné des colonies L soit sur milieu habituel, soit sur milieu à la DL-méthionine, avec cependant une bien moins grande fréquence ; ce sont trois vibrions des eaux.

Bien entendu, ces 10 germes nous ont donné facilement la transformation L, mais avec certains avantages. Tout d'abord la fréquence d'obtention du cycle L vrai devient aussi grande pour les vibrions que pour les *Proteus*. Ensuite, il y a un avantage quant au nombre des colonies L obtenues.

Ainsi la souche de *Proteus* P18 donne 50 fois plus de colonies L sur notre milieu. De même la souche de vibrion EZ5, qui, sur milieu habituel, nous a donné de très rares colonies au cours de nombreux essais et sur milieu à la DL-méthionine, nous a donné plus facilement le cycle L, nous donne avec ce milieu des boîtes couvertes de plusieurs centaines de colonies L.

Une autre remarque est à faire : c'est le raccourcissement de la durée d'obtention des formes naines. Ce temps, qui est normalement de l'ordre de deux à quatre jours, se réduit avec notre milieu à une durée de vingt-quatre à quarante-huit heures.

3° Nous avons pu repiquer sur ce milieu les différentes souches de formes naines (formes L) et de P. P. L. O., que nous possédons au laboratoire. Toutes se sont repiquées et avec les avantages que nous venons de voir.

4° Nous avons essayé ensuite de voir quel était l'élément actif de la solution saline. Pour cela nous avons essayé la transformation des souches P18 et EZ5 sur un certain nombre de combinaisons des constituants de la solution de Hanks. Ce travail est en cours. Nous en donnons les premières conclusions : aucune combinaison n'a un effet favorable comparable à celui de la solution entière. D'autre part, le ClNa, à lui seul, nous a donné des résultats bien moins intéressants.

En conclusion, l'obtention de formes naines des bactéries est grandement facilitée par l'adjonction aux milieux habituels de sels sous forme de solution saline balancée, solution concentrée de Hanks.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. A. MEDILL et D. J. O'KANE. *J. Bact.*, 1954, **68**, 530.  
[2] J. T. SHARP. *Proc. Soc. Biol. exp. Med.*, 1954, **87**, 94.  
[3] R. TULASNE et J. LAVILLAUREIX. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 588.  
[4] R. TULASNE, T. TERRANOVA et J. LAVILLAUREIX. *Giorn. Microbiol.*, 1955, **1**, 43.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Recherches sur la mesure de l'activité hémicellulolytique des sols. II. Etude théorique**, par J. AUGIER.

**Concentration des liquides amniotiques et allantoïques infectés par des virus au moyen de la dialyse contre le polyvinylpyrrolidone**, par D. LEKA, R. MORET, R. SOHIER et J. TIGAUD.

**A propos de l'immunité dans la syphilis expérimentale. La notion de refus cellulaire**, par P. GASTINEL, P. COLLART et A. VAISMAN.

**Effets des hautes pressions sur le virus de la poliomyélite (souche Lansing)**, par J. BASSET, P. LÉPINE et L. CHAUMONT.

**Recherches sur les prolysines. I. La prolysine du phage Fcz. II. Le cas général de la synthèse des prolysines**, par J. PANIJEL et J. HUPPERT.

**Détection d'anticorps incomplets anti-leucocytaires**, par V. REJHOLEC, L. DONNER et M. REPIC-SLECHTA.

**Etude de la réaction d'agglutination des globules rouges sensibilisés par un immusérum au cours des rhumatismes inflammatoires aigus**, par A. EYQUEM, F. JACQUELINE et E. JOCHEM.

**Application à la tuberculose d'une technique de fixation du complément utilisant l'hémolyse à 50 p. 100. Comparaison des résultats obtenus avec ceux de l'hémagglutination passive**, par M. VÉRON.

**Etude, par la méthode électrophorétique, de la toxine diphtérique purifiée**, par E.-H. RELYVELD, P. GRABAR, M. RAYNAUD et C. H. WILLIAMS.

**Détermination du titre anti-alpha des sérums anti-perfringens A**, par M. GUILLAUMIE, A. KREGUER, M. GEOFFROY et A. DEBRESLES.



## LIVRES REÇUS

*Pharmacopoea Internationalis*. Première édition, vol. II, World Health Organization, Genève, 1955. xx+350 p. Prix : 20 francs suisses, 1,15 livres ; 6,75 dollars. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson et C<sup>ie</sup>, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.)

*La Poliomyélite*. OMS, Série de Monographies n° 26, Genève 1955, 430 p. Prix : 24 francs suisses, 2 livres, 8 dollars. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson et C<sup>ie</sup>, 120, boulevard Saint-Germain, Paris.)

La nouvelle monographie publiée par l'OMS sur la poliomyélite contient des exposés d'ensemble sur divers aspects du problème, classés sous cinq grandes rubriques : épidémiologie, aspects cliniques, virologie, immunologie, protection. La question du traitement est passée en revue dans les articles de R. Debré et S. Thieffry, de W. R. Russell et surtout dans celui de H. C. A. Lassen, qui décrit le traitement d'urgence applicable dans les cas de troubles respiratoires et de paralysie bulbaire. La section consacrée à la virologie contient une mise au point générale sur les techniques de culture tissulaire du virus. D'autres chapitres sont consacrés à l'épidémiologie, à l'immunologie et à la lutte contre la maladie. Trois études traitent de l'immunisation, seule mesure de protection dont on puisse espérer des résultats efficaces.

H. T.

G. Dalldorf. — *Introduction to virology*. 1 vol., 99 p., Charles C. Thomas édit., Springfield, Ill., U. S. A. édit., 1955. Prix : 3,50 dollars.

Nos connaissances sur les virus ont fait de rapides progrès au cours de ces vingt dernières années, et le but du présent volume est d'en donner au lecteur un aperçu. L'ouvrage ne prétend pas être complet, mais offrir un panorama des problèmes rencontrés dans le domaine des virus, aux Etats-Unis en particulier. Il est divisé en deux parties, la première concernant la classification, le diagnostic, la pathogénie et l'immunologie des principaux virus ; la seconde, les techniques et les instruments permettant leur étude, l'équipement des laboratoires et les principaux dangers auxquels le chercheur peut être exposé, ainsi que les précautions à prendre pour les éviter.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.